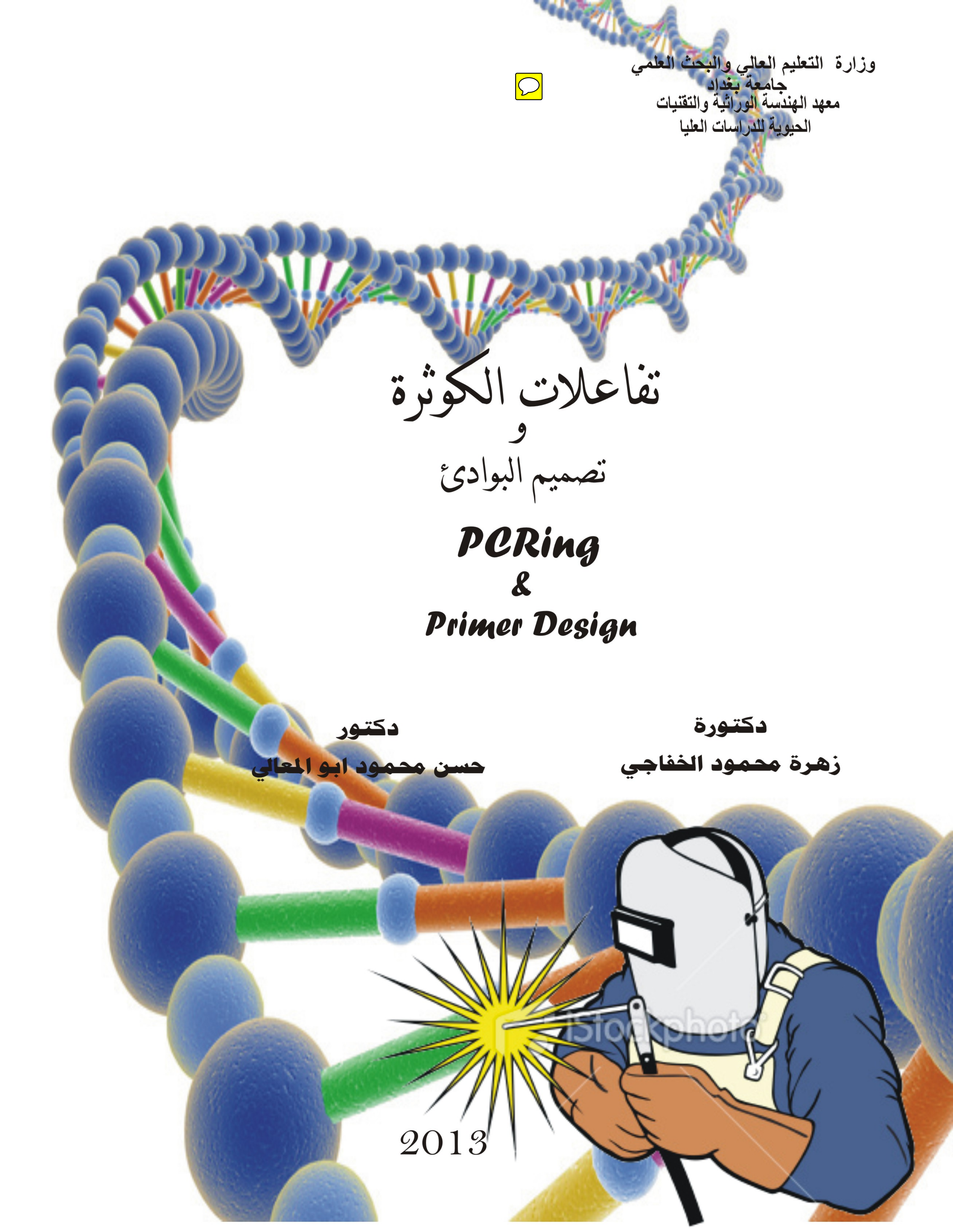


وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بغداد
معهد الهندسة الوراثية والتقنيات
الحيوية للدراسات العليا

تفاعلات الكوثرة
و
تصميم البوادئ

PCRing
&
Primer Design

دكتورة
زهرة محمود الخفاجي

دكتور
حسن محمود ابو المعالي

2013

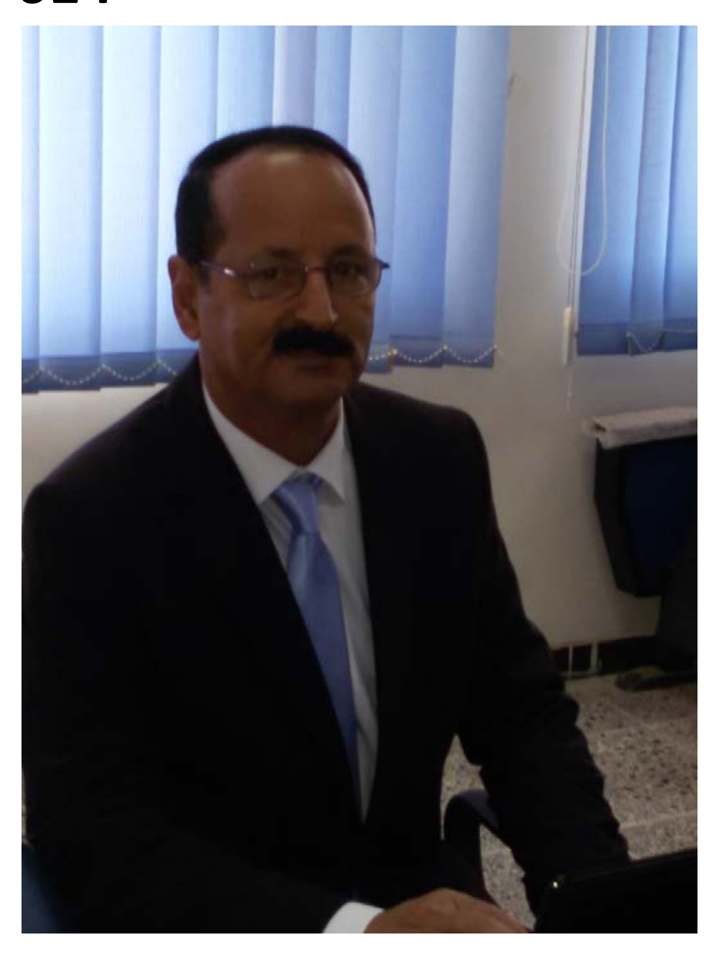
مع تحيات د. سلام حسين الهلالي

salamalhelali@yahoo.com

https://www.facebook.com/salam.alhelali

https://www.researchgate.net/profile/Salam_Alhelali?ev=hdr_xprf

07807137614



أَعُوذُ بِٱللَّهِ مِنَ ٱلشَّيْطَٰنِ ٱلرَّجِيمِ

بِسْمِ ٱللَّهِ ٱلرَّحْمَٰنِ ٱلرَّحِيمِ

﴿ وَعَلَّمَكَ مَا لَمْ تَكُن تَعْلَمُ ۚ وَكَانَ فَضْلُ ٱللَّهِ عَلَيْكَ عَظِيمًا ﴾

سورة النساء: جزء من الاية 113

المقدمة

الحمد لله على ما اعطى وتفضل وله الثناء الحسن كما يحب ربنا ويرضى ،
والصلاة والسلام على النبي الامين وآله الطيبين الطاهرين واصحابه الغر الميامين
ومن تبعهم بأحسان الى يوم الدين .

هذا الكتاب مشاركة بسيطة لفهم احدى التقنيات القديمة الحديثة وهي تفاعلات الكوثرة خارج الانظمة الحية للمواد الوراثية (PCR) التي دخلت البلد مؤخرا واصبح استعمالها واسعا جدا ... لذلك كانت هناك مبادرة لتوضيح بعض النقاط وبرامج الحاسوب الملائمة ذات العلاقة ببدء التقنية مثل تصميم البوادىء وايجاد الظروف الملائمة لاجراء التفاعلات فضلا عن البرامج اللازمة لتحليل نواتج التفاعلات ودراستها .

نتقدم بالشكر للاستاذ وسام حازم / معهد الهندسة الوراثية لتفضله بقراءة مسودات الكتاب وابداء الملاحظات القيمة ، ونتقدم بالشكر للاستاذ نذير بشير محمود لتصميمه غلاف الكتاب وفهرسة الكتاب ، والشكر موصول لكل من بادر ولو بكلمة تشجيع اثناء كتابة ونحضير هذا الكتاب .... ونسألكم الدعاء الطيب لنا ولوالدينا ....

المؤلفان

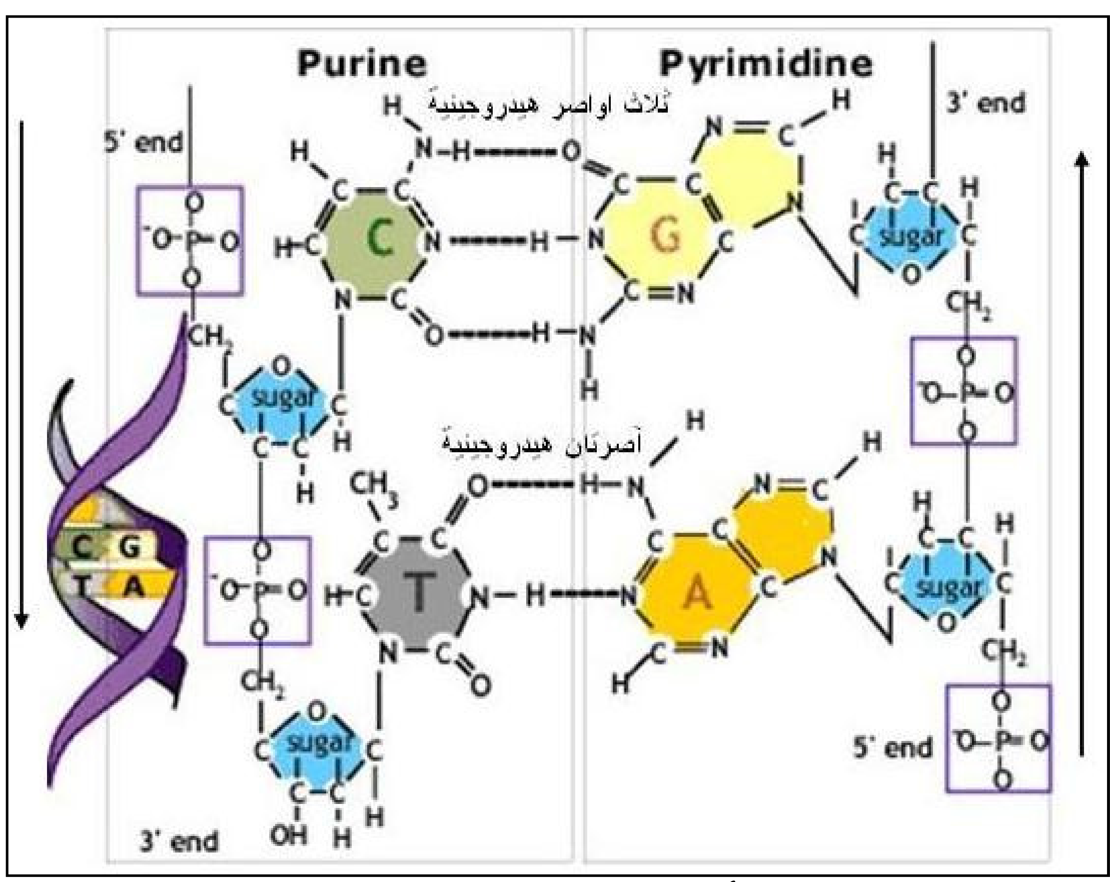
كانون الثاني / 2013

الفصل الاول	
تضاعف المادة الوراثية	
تطور الدراسات الوراثية	
تفاعلات الكوثرة خارج الأنظمة الحية	
مختصر عملية الكوثرة	
أنواع وتحويرات تفاعلات الكوثرة	

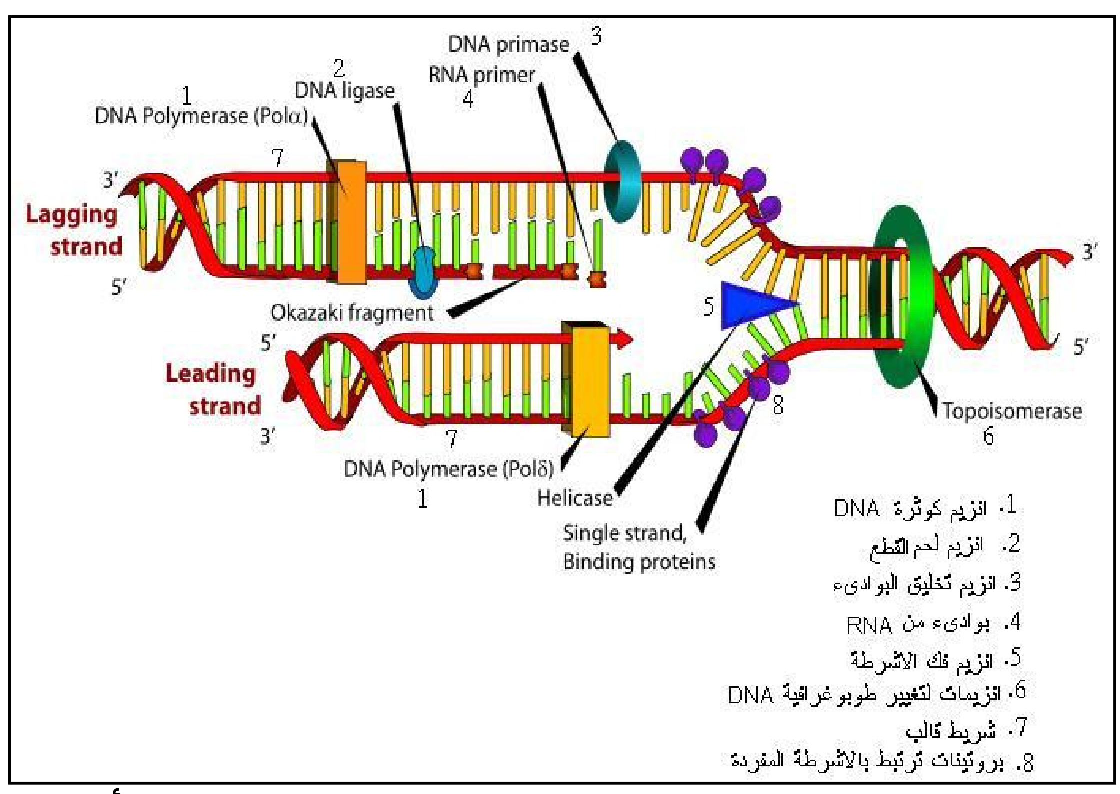
تفاعلات الكوثرة المختلفة

تضاعف المادة الوراثية

يحدث تضاعف المادة الوراثية داخل الخلية الحية بمساعدة العديد من الإنزيمات والبروتينات والتي تعمل متكاتفة أثناء نمو وانقسام الخلايا . وتوضح الأشكال التالية أهم مجريات العملية (شكل 1 و شكل 2) .



شكل 1: الأواصر الرابطة بين شريطي DNA



شكل 2 : الإنزيمات العاملة في عملية تضاعف DNA في داخل الأنظمة الحية

واهم ما يوضحه الشكل 1 هو اتجاهات الأشرطة المتعاكسة وعدد الأواصر الهيدروجينية بين القواعد النتروجينية المكونة للأشرطة المفردة (القالب ، Template) . أما الشكل 2 فيوضح أهم الإنزيمات والبروتينات العاملة في تضاعف شريطي DNA . وفضلا عن الإنزيمات المذكورة هناك إنزيمات أخرى تتعامل مع الحوامض النووية و هي إنزيمات القطع Restriction enzymes سواءا كانت الخارجية Exonucleases التي تقطع الحوامض النووية من الأطراف او إنزيمات القطع الداخلية Endonucleases التي تقطع الحوامض النووية في داخل التواليات (Sequences) عند وجود قطعة محددة التوالي من القواعد تمثل مواقع التعرف للإنزيم .

وإنزيمات القطع هذه مهمة في دفاع الخلية ضد الغازيات مثل الفيروسات . وفضلا عن هذا فان إنزيمات القطع وبالتعاون مع إنزيمات اللحم Ligase تعمل على أيجاد تشكيلات وراثية جديدة لتنتج DNA المتأشب (Recombinant DNA) الذي يكون ذو أصول مختلفة . ومن الإنزيمات الأخرى التي تجد مكانا لفعاليتها أثناء التضاعف إنزيم Helicase الذي يفك الأشرطة وإنزيمات Topoisomerases المسئولة عن طبوغرافية جزيئات DNA .

تطور الدراسات الوراثية

بعد التعرف على العمليات التي تجري داخل الخلايا استغلت هذه في مجالات عدة منها تشخيص الأمراض الوراثية المبكرة وإيجاد العلاجات لها ، ففي الوقت الحاضر هناك العديد من العلاجات التي تنتج باستعمال الهندسة الوراثية ، اذ أمكن خلط جينات من مصادر مختلفة من أنواع مختلفة في أنبوبة اختبار ثم نقلها إلى خلايا حية مضيفة للتضاعف والتعبير عنها . وساعدت في فهم الأسس الوراثية للخلايا حقيقية النواة وعمليات خياطة جيناتها Gene splicing ضمن ما يعرف بعملية الكلونة Cloning . وتمتاز عملية الكلونة بقلة الأخطاء من حيث إدماج قاعدة بالخطأ في الشريط الجديد نظرا لوجود خاصية التصحيح Proofreading (3' – 5' exonuclease) في الإنزيمات العاملة داخل الأنظمة الحيوية . وتحتاج عمليات الإنتاج الى وفرة في المواد الوراثية وهي المتحققة بالكلونة داخل الخلايا ولكن هذه العملية تأخذ وقتا طويلاً يصل الى الأسابيع حتى عند استعمال أحياء سريعة النمو مثل البكتريا ، كما ان البحث عن أهداف محددة من DNA تكون مجهدة ومكلفة وذلك لان الأهداف تكون بين كتل كبيرة من الجينات الموجودة في النماذج البايولوجية .

تفاعلات الكوثرة خارج الأنظمة الحية Polymerase chain reaction (PCR)

في نهاية ثمانينيات القرن المنصرم وبعد الدراسات المستفيضة لعملية تضاعف الحوامض النووية (DNA) أمكن محاكاة عملية التضاعف خارج الأنظمة الحية ولكن مع بعض الاختلافات لتظهر تفاعلات الكوثرة PCR التي كانت بجهود Kary Banks Mullis وفريقه البحثي .

و يمكن تعريف تفاعلات الكوثرة (في مجال تخصص الكتاب) على انها تضخيم Amplification أي عمل نسخ كثيرة من أجزاء معينة من جزيئة DNA خارج الأنظمة الحية بمقياس لوغاريتمي او تزايدي ، أي ان الجريئة الواحدة تنتج اثنين ، والاثنين تنتج أربعة وهكذا بشكل تزايدي . وبذا يمكن وضع تعريف آخر للعملية على انها تفاعل إنزيمي بسيط نوعا ما يعتمد أوليات رياضية بسيطة .

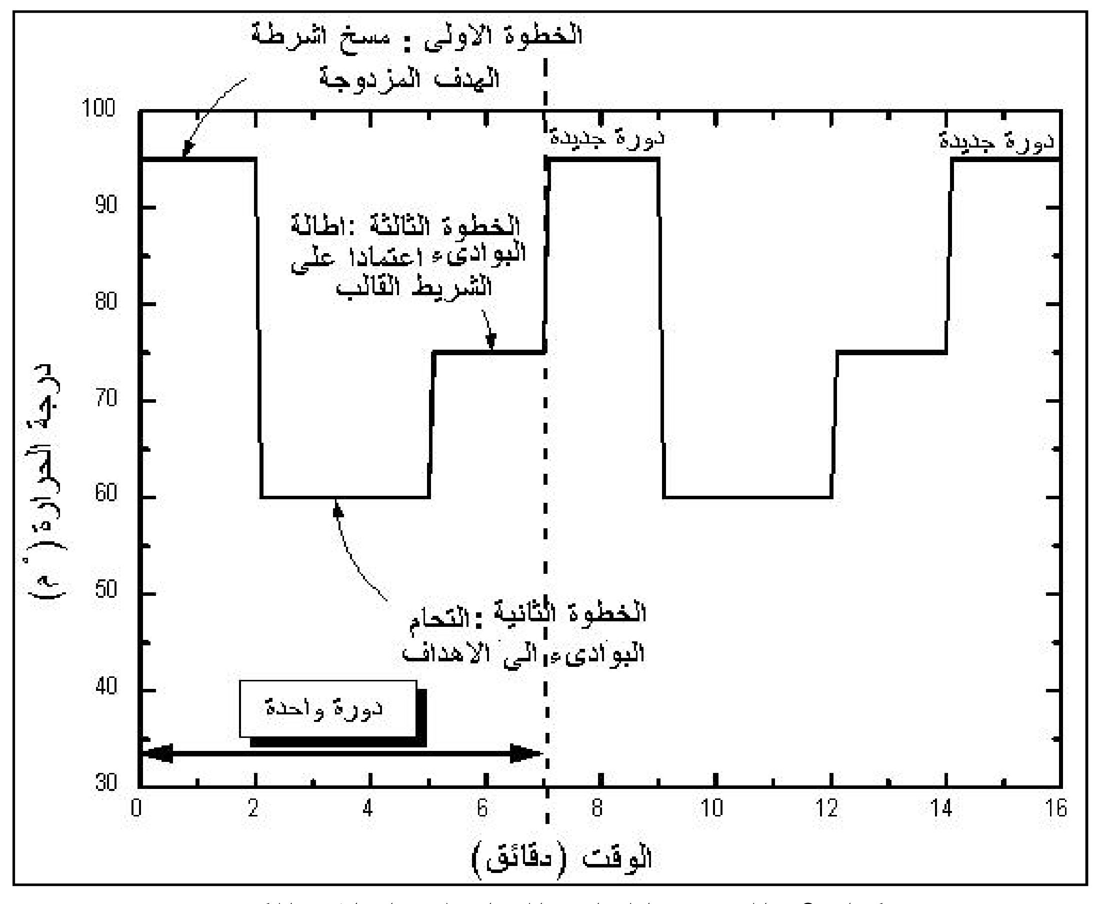
مختصر عملية الكوثرة

يتكون خليط تفاعل الكوثرة وبشكل مختصر من الآتي :

- نموذج DNA ، أي الهدف المراد تضخيمه .
- زوج من البوادئ احدهما أيسر والآخر أيمن للجزء المراد تضخيمه التي تلاؤم Match نهايتي القطعة المستهدفة .

• إنزيم كوثرة DNA (DNA polymerase) لغرض البدء بالبناء لإطالة البوادئ واتخاذ أشرطة الهدف كقوالب يستند اليها في إضافة القواعد النتروجينية لإطالة البوادئ .
• نسب متساوية من النيوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات منقوصة الأوكسجين Deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) الأربعة (C. T. G.A) التي تعمل كأحجار بناء لإطالة البادئ والتي يضيفها إنزيم الكوثرة .
• محلول دارئ Buffer لجعل الظروف الكيماوية مثلى لحدوث تفاعل الكوثرة عن طريق الحفاظ على الفعالية القصوى لمكونات التفاعل ودرء التغير في الرقم الهيدروجيني pH .
• ايونات ثنائية التكافؤ وعادة تكون أيونات المغنسيوم Mg^{++} وأيونات أخرى أحادية التكافؤ وتكون عادة أيونات البوتاسيوم K^{+} .
• بعض المضافات Additives التي تستعمل في بعض الأحيان لتحسين أداء التفاعل .

وتتفاعل هذه المكونات ضمن نسق حراري محدد في درجات حرارية متعاقبة كما هي موضحة في الشكل 3 .



شكل 3 : النسق الحراري العام لتفاعلات الكوثرة

ففي البداية يتم تسخين الخليط الى درجة حرارية عالية بمدى 90-95 °م لغرض فصل الأشرطة المزدوجة لجزيئات DNA الخاصة بالنموذج اي حصول المسخ Denaturation ، عن طريق تكسير الأواصر الهيدروجينية التي تربط شريطي جزيئة DNA ببعضها والتي توصل بين القواعد النتروجينية المكونة لهما ، بعد ذلك تخفض درجة الحرارة الى درجة حرارية ضمن مدى 50- 68 °م لمدة لا تقل عن 30 ثانية لغرض إتاحة فرصة كافية للبوادئ المستعملة للارتباط مع أشرطة الهدف اعتمادا على تكامل القواعد النتروجينية وتسمى هذه المرحلة الالتحام Annealing step ، يلي ذلك رفع درجة الحرارة الى حوالي 68-72 °م اعتمادا على نوع إنزيم الكوثرة المستعمل وطول الهدف وأمور أخرى . وتكون الإنزيمات المستعملة من الأنواع التي تعمل بدرجات حرارية عالية – كما سيأتي ذكره لاحقا- . وأثناء هذه المرحلة يتم إضافة النيوكليوتيدات (dNTPs) على الشريط الناشئ من إطالة البادئ استناداً الى ما يكملها من القواعد على الشريط القالب او الهدف ، أي حدوث عملية الإطالة Extension step . تعاد العمليات المذكورة (الدورة) لمرات عديدة لحين الوصول الى كمية من DNA (الهدف) كافية لعمليات الكشف والدراسة . وتستغرق كل دورة حوالي 5 دقائق بما فيها المدة اللازمة لكل من عمليات رفع الحرارة وتخفيضها وفق المخطط أعلاه .
ثم يصار الى الكشف عن نواتج التفاعل باستعمال أكثر من طريقة ومن أهمها والواسعة الاستعمال هو الترحيل الهلامي Gel electrophoresis للكشف عن القطع المستهدفة ومعرفة حجومها بالمقارنة مع قطع من DNA معروفة الحجم والوزن (DNA ladder) . وتكون عملية الكشف والإظهار باستعمال صبغات او مواد مثل بروميد الاثيديوم Ethidium bromide الذي يعطي تألقا عند تعريضه للضوء فوق البنفسجي (Ultra violet light) .

أنواع وتحويرات تفاعلات الكوثرة

قبل الخوض في تفاصيل عملية الكوثرة وخصوصيات كل مفردة فيها لابد من المرور السريع على الأنواع التي تطورت من العملية الأصلية في نهاية الثمانينات من القرن الفائت ، اذ يمكن التحوير بطرق عدة وعند خطوات مختلفة للمساعدة في دراسة وتحليل DNA ، وكل نوع من التطوير اخذ جانبا وطوره وحوره ليلاءم الغرض المطلوب ولكن بقيت الخطوط العريضة وسيتم التطرق الى بعض الأنواع دون شمول الجميع الذي لا يدرك حيث ان التحويرات في هذه التقنية كثيرة جدا وتشهد تطورا مستمرا .

الطريقة القياسية Standard PCR

الطريقة الأكثر شيوعا من حيث الاستعمال ويتم تضخيم قطع تتراوح بين 100-1000 قاعدة نتروجينية ، وتضخيم قطع اكبر يلزمه أنواع خاصة من إنزيمات الكوثرة . وتحتاج العملية الى بعض المعلومات حول التوالي المراد تضخيمه لغرض تصميم البوادئ . وتستعمل في تضخيم الأشرطة المزدوجة او المفردة . وتعتمد طريقة التحليل عند استعمالها على النواتج النهائية End-point products وذلك بفصلها على الهلام او أي طريقة أخرى وبهذا فهي تعاني من بعض المشاكل التي سيرد ذكره في موقع آخر .

طريقة (AFLP PCR)

طريقة Amplified fragment length polymorphism PCR لها تطبيقات عدة والطريقة حساسة جدا وتعتمد على تفاعل الكوثرة لتحديد التغيرات في جزيئة DNA لذلك تستعمل في التنميط الجيني Genotyping للأشخاص لتحديد العديد من المواقع Loci باستعمال عدد قليل من تفاعلات PCR . وملخص الطريقة ان جزيئات DNA الخلوي يتم تقطيعها بإنزيم قاطع واحد او أكثر والتي يفضل ان تكون مواقع تعرفها او تمييزها Restriction sites مكونة من أربعة قواعد نتروجينية مثل MseI ويمكن استعمال إنزيمات قاطعة أخرى لها مواقع تعرف او تمييز مكونة من ست قواعد نتروجينية مثل EcoRI ثم تربط القطع الناتجة من الهضم الى مكيفات Adaptors او وصلات Linkers ثم إجراء تفاعل PCR أولي الذي يحتوي على بوادئ ملائمة للارتباط بالقطع الموصلة بجزيئات DNA (لتؤدي الى تضخيمها) ، ثم تفصل المتضخمات Amplicons على الهلام وإظهار الحزم .

Alu PCR

طريقة تستعمل لتضخيم تواليات Alu (Alu sequences) في الجينوم البشري والثدييات القريبة منه . وبهذا التفاعل يتم تحديد المواقع الجينومية المحاطة بتواليات Alu لتساعد في تحديد التغايرات والطفرات في الجينات قيد الدراسة أي تحديد البصمة الوراثية Fingerprinting من DNA غير معروف . وقد طورت الطريقة لتعتمد على التحديد الكمي كما في استعمال RT-PCR (الذي سيأتي ذكره لاحقا) باستعمال صبغات SYBR الحساسة لكميات صغيرة بين مدى بيكوغرام – نانوغرام لتوفر فرص جيدة في العمل الجنائي .

الكوثرة الخاصة بالأليلات Allele specific PCR

تفاعل يتخصص بتحديد الصور او الأليلات المختلفة للجينات ويستعمل في التشخيص والكلونة وتحديد SNPs ويكون معتمدا على تصميم بوادىء متخصصة جدا Allele specific oligonucleotide (ASO) التي تلتحم مع التوالي الذي يلائمها او يكملها تماما وعند وجود حالة عدم تلاؤم Mismatch ولو في قاعدة واحدة فان ذلك سيمنع التهجين او الارتباط تحت الظروف الملائمة .

ويستعمل التفاعل لتحديد التغاير في نيوكليوتيد واحد Single nucleotide polymorphism (SNP) . لذا تستعمل بوادىء خاصة بالتغاير الذي تكون النهاية ' 3 من البادئ حاوية على التغاير (SNP) . وهذا يعني الحاجة الى معرفة سابقة بتوالي DNA الذي يشمل الفروق بين الأليلات وبذا يمكن في هذه الحالة الرجوع قواعد البيانات الخاصة بها .

تفاعلات الكوثرة التجميعية Assembly PCR

تختلف أهداف هذه الطريقة عن عموم الاستعمال وذلك لانها تستعمل لتخليق تواليات طويلة من DNA أي قطع صناعية خارج الأنظمة الحية وتكون البوادئ في هذه الطريقة هي جزيئات DNA القالب نفسه و تستعمل هذه الطريقة لبناء الجينات التي يكون طولها عادة اكبر من الطول الذي يمكن إنتاجه بتفاعل PCR الاعتيادي حيث يتم تضخيم أجزاء منفصلة من الجين نفسه ومن ثم جعل نهايات نواتج تفاعل PCR ذات قابلية للتكامل مع بعضها ومن ثم تجمع سوية بتفاعل الكوثرة التجميعية للحصول أخيرا على جين كامل الطول ويمكن عندها استخدامه في عمليات الكلونة .

تفاعل الكوثرة غير المتناظر Asymmetric PCR

يهدف التفاعل الى تضخيم شريط واحد من DNA الأصلي أكثر من الشريط الثاني لأغراض عدة مثل تحديد تواليات معينة او تهجين المجسات Probe hybridization . ويجري التفاعل مثل ما هو في تفاعل الكوثرة القياسي عدا إضافة تراكيز عالية من بادئ الشريط المراد تضخيمه . وبذا تكون عملية التضخيم بطيئة وتحتاج الى عدد إضافي من الدورات .

وقد طورت طريقة LATE PCR (Linear- after- the -exponential) وفيها يستعمل بادئ يسمى المحدد Limiting primer ذو درجات انصهار Tm عالية التي تفوق الدرجة الحرارية اللازمة للحفاظ على كفاءة وتوازن التفاعل . ويضاف البادئ بكميات كبيرة وبذا

يكون هذا البادئ قد أنهى مهمته في مرحلة مبكرة قد تصل او تتجاوز المرحلة الوسطية للتفاعل .

تفاعل الكوثرة المعتمد على إنزيم فل الأشرطة Helicase- dependent amplification PCR

تفاعل تستبدل فيه عملية مسخ او انصهار الأشرطة بالحرارة بالمعاملة الإنزيمية وقد ذكر في مستهل الموضوع ان إنزيم فل الأشرطة Helicase هو الذي يقوم بفتح الأشرطة المزدوجة الى أشرطة منفردة وتساعده في ذلك عدد من البروتينات الرابطة للأشرطة المفردة للمحافظة على الأشرطة بحالة منفردة والإنزيمات المسؤلة عن التوزيع الشكلي او الطبوغرافي لجزيئة DNA وهي Topoisomerases .

وعند بدء التفاعل يترك الإنزيم لفل الأشرطة ثم تتم بعد ذلك خطوات التفاعل التقليدية برفع وخفض درجات الحرارة وهي الطريقة المطبقة في الوقت الحاضر .

طريقة البدء الساخنة Hot-start PCR

طريقة تبدأ باستعمال درجة حرارة عالية تتراوح بين (92- 95 °م) لمدة 5 دقائق تقريبا ليتم بعدها الشروع بتفاعل الكوثرة الاعتيادي . والأسباب وراء ذلك ان بعض الإنزيمات حتى تلك النشطة بدرجات الحرارة العالية مثل Taq polymerase الذي يستعمل بكثرة تبقى محتفظة بفعاليتها بشكل منخفض بدرجات الحرارة الواطئة مثل درجة حرارة 37°م او حتى درجة حرارة الغرفة ويؤدي ذلك الى ظهور نواتج تضخيم غير مستهدفة نتيجة عدم دقة البادئ في الارتباط بالجزء المستهدف في جزيئة DNA القالب وارتباطه في مواقع أخرى Mispriming أثناء عمليات إعداد خليط التفاعل وتحضيره ، كما ان حضن خليط التفاعل بدرجات حرارة اقل من درجة الانصهار Tm يؤدي الى تكوين مزدوجات البادئ Primer dimers لذلك تحور الطريقة بحيث يوقف عمل إنزيم الكوثرة Polymerase تماما بإغلاق الموقع الفعال في الإنزيم بمواد معينة لمنع حصول تفاعل الكوثرة قبل الشروع بتشغيل جهاز Thermal cycler ومن ثم تكفي خطوة المسخ الأولي Initial denaturation بإبطال عمل المادة الغالقة والشروع بتفاعل الكوثرة . وتتم عملية غلق عمل إنزيم الكوثرة بأحد الطرق الآتية :

1- إجراء تحويرات كيماوية لإنزيم الكوثرة بحيث لا يعمل بالدرجات الحرارية الواطئة وإنما ينشط وتفك منه المعوقات الكيماوية عند التسخين .

2- ربط الإنزيم بالأجسام المضادة Antibodies مما يؤدي الى تثبيط فعاليته بالحرارة الاعتيادية ، ولكن عند رفع درجة الحرارة الى 95 °م مثلا فان ذلك يؤدي الى مسخ الجسم المضاد ألبروتيني المرتبط به ليترك الإنزيم ليمارس فعاليته .

-3 استعمال حواجز شمعية او زيتية تحول دون قيام الإنزيم بأي فعالية بدرجة حرارة الغرفة وعند رفع الحرارة ينصهر الشمع ويسمح للإنزيم بمزاولة فعاليته ، وعند استعمال مثل هذه النماذج لتحديد التوالي Sequencing لنواتج التفاعل لابد من إزالتها وتنظيف النموذج .

-4 إحداث طفرات مثل الطفرات الشرطية Conditional mutants في الكائن المنتِج بحيث ينتج إنزيم ا يكون فعالا بالدرجات الحرارة العالية أي انه يهندس وراثيا قبل إنتاجه .

لذا تكون الطريقة الأعم هي تحضير كافة مكونات خليط التفاعل ثم خلطها جميعا وتكون المادة الغالقة لعمل إنزيم الكوثرة فعالة لحين الانتهاء من خلط جميع النماذج ثم يوقف عمل المادة الغالقة برفع درجة حرارة الخليط أعلى من 92°م .

وهذا النوع من التحويرات يتخذ طريقتين الأول المذكور آنفا وهو اكتساب الإنزيم فعاليته بعد رفع درجة الحرارة وهذا ما يسمى بطريقة البدء الساخنة التقليدية Conventional hot start PCR . أما الطريقة الأخرى فان التنشيط يكون أثناء العملية أي ان الإنزيم ينشط ببطيء وبمرور الوقت ويطلق عليها Hot-start and time release PCR وتستعمل لأغراض خاصة مثلا عند وجود كميات قليلة من واسمات Markers المرضات ، او كون نماذج DNA المستعملة متحللة او للتميز بين الأليلات ، و كذلك تستعمل لتفاعلات الكوثرة المتعددة Multiplex PCR .

تفاعل الكوثرة العكسي Inverse PCR (IPCR)

إحدى التحويرات لعملية الكوثرة الاعتيادية ، ولكن يتم تضخيم المناطق المحيطة بمنطقة معروفة . وتشمل العملية عدد من خطوات الهضم بالإنزيمات القاطعة . والقطع المعروفة التوالي قد تكون مقحمات Inserts وهذا يسهل معرفة المناطق غير المعروفة التي استقرت فيها .

تفاعل كوثرة المستعمرة Colony PCR

تفاعلات تجري على مستعمرات البكتريا الخاصة التي تكون قد تعرضت لعمليات تغير وراثي مثل إجراء عمليات التحول الوراثي Genetic transformation ، أي إجراء مسح للتحري عن المستعمرات التي التقطت الجين او الصفة ، وفيها يتم تعليق الخلايا المأخوذة من مستعمرات مختلفة كل على حدة في محلول لتحليل الخلايا او تعرض الى درجات حرارية عالية لتكسير الخلايا وانطلاق DNA منها .

ثم تجري عملية او تفاعل الكوثرة الاعتيادية باستعمال وتصميم بوادىء خاصة بالمواد الوراثية التي أقحمت داخل الخلايا ولذلك فان المستعمرات التي تعطي حزم بالوزن الجزيئي المحدد للقطع المقحمة تكون هي المستعمرات التي التقطت خلاياها هذه الصفة .

تفاعل الكوثرة الموضعي *In situ* PCR

تفاعل كوثرة يتم داخل الخلايا او الأنسجة المثبتة على وسائل صلدة مثل الشرائح الزجاجية ، ويمكن ان يتم بشكل مباشر على DNA وبشكل غير مباشر على RNA بعد نسخه العكسي الى DNA .

وتفيد التقنية في الكشف عن الأمراض في بدايتها حيث تكون التغييرات في الكميات صغيرة جدا مقتصرة على تجمعات صغيرة من الخلايا او الأنسجة الأساسية في توليد الأمراض ، وذلك لان بعض الأمراض تكون بطيئة التطور وتحتاج الى شهور او سنين لتصبح واضحة سريريا . ومثل هذه الخلايا وكما وجد تكون غير فعالة من ناحية الانتساخ Transcription . وتستعمل طرق التهجين او تفاعلات الكوثرة او الاثنين معا لفحص التعبير وأيجاد الجين المتأثر أثناء حدوث المرض . ويتم عزل الحوامض النووية من مجموعة الخلايا او مجموعة ثانوية من الخلايا التي تحتوي على نسخ بعدد قليل (حتى ولو نسخة واحدة) ثم تضخم بتقنية تفاعل الكوثرة ، ثم يتم الكشف عن نواتج التضخيم .

ففي حالة التهجين الموضعي In situ hybridization (ISH) تستخدم تقنية تهجين الحوامض النووية على مستوى الخلية بعد إقرانها بوسائل الكيمياء الخلوية والمناعية وبذلك تسمح هذه التقنية بالكشف عن الواسمات الخلوية الذي يساعد في تحديد موقع تواليات او واسمات معينة في خلايا التي توجد في مجمع من الخلايا مثل في نوع خاص من الأنسجة او الدم . و نظرا لمحدودية عدد النسخ لتواليات DNA لذا يكون تهجين RNA أكثر حساسية من الكشف عن DNA .

أما في حالة تفاعلات الكوثرة فيتم تضخيم هدف محدد داخل الخلايا المثبتة ، سواء بشكل مباشر او غير مباشر وتكون العملية محددة بعدة عوامل منها تعقيد الظروف داخل الخلايا التي تؤثر في كفاءة إنزيم الكوثرة وكذلك عمليات الانتشار لنواتج تفاعل الكوثرة . ونتيجة لذلك تكون الأوقات المستغرقة أطول من تلك الخاصة بنظام PCR التقليدي الذي يكون ضمن وسط سائل وهو الوسط المائي في العادة .

تفاعلات كوثرة التواليات الداخلية InterSequence-Specific PCR (ISS PCR)

طرق تعمد الى تحديد البصمة الوراثية DNA fingerprinting اذ يتم فيها تضخيم المناطق البينية مثل المكررات الواقعة بين تواليات بسيطة Simple sequence repeat

(SSR) لإعطاء البصمة الوراثية للقطع المتضخمة ، وتكون وسيلة ملائمة للتصنيف التطوري لجينومات الأحياء مثل خلايا بدائية النواة ، فضلا عن استخدامها في التشخيص وتحديد النمط الجيني للأحياء المجهرية الممرضة ، وتستخدم في تقنيات Alu – PCR .

تفاعلات الكوثرة الطويلة Long PCR

طريقة استبدلت فيها قطعة Klenow التي تضخم بحدود 400 قاعدة بإنزيمات أخرى لتضخيم قطع من DNA طولها أكثر من 5 كيلوقاعدة وعادة تكون بحدود 10 كيلوقاعدة ، في هذه الحالة تؤخذ الاحتياطات لإنجاح التضخيم مثل استعمال إنزيمات كوثرة خاصة مثل Pfu polymerase او غيره من الإنزيمات التي لها القابلية على بناء قطع DNA اكبر من 5 كيلوقاعدة مثل HF polymerase و TLA polymerase و Top polymerase وتفيد هذه الطريقة في تضخيم القطع الطويلة من DNA لأغراض مختلفة مثل بناء الجينات والتي لا تتمكن الطرق الاعتيادية من تحقيقه .

تفاعل كوثرة المناطق المثيلة Methylation specific PCR

طريقة تستعمل لتضخيم المناطق التي تحصل فيها إضافة لمجاميع المثيل مثل تشخيص جزر CpG في DNA الجينومي (gDNA) بدلا من استعمال الإنزيمات الحساسة لوجود مجموعة المثيل . وفيها تعامل جزيئات DNA القالب بمادة Na-bisulfite الذي يحول قواعد السايتوسين الخالية من المثيل الى يوراسيل . ثم يتم تصميم نوعين من البوادئ ،احدهما يضخم الجزيئات غير الحاوية على المثيل والأخرى تضخم الأهداف الحاوية على المثيل ، ثم تحلل نواتج تفاعلات الكوثرة .

تفاعل الكوثرة المتعدد Multiplex PCR

في هذه التقنية يتم تضخيم أكثر من هدف في تفاعل واحد لإنتاج قطع DNA مختلفة بإحجام مختلفة الخاصة بتواليات مختلفة (استهداف مجموعة من الجينات او أي تواليات أخرى) . ويعتمد نجاح التفاعل على البوادئ المصممة ، ويفضل استعمال بادئ خاص لكل هدف مع التلاعب بدرجات حرارة الالتحام لتلاؤم كل بادئ والمتضخم الناتج عنه كي تعمل بشكل صحيح في تفاعل واحد ويجب ان تكون النواتج بإحجام مختلفة لإعطاء حزم واضحة عند الترحيل الكهربائي على الهلام او عند استعمال أي وسيلة إظهار أخرى .

و في بعض الأحيان يمكن تصميم بادئ واحد يمكن ان يرتبط الى مناطق مختلفة على الأهداف المختلفة كما في حالة استعمال Multiplex ligation – dependent probe

amplification (MLPA) وبالتالي يمكن تجنب محددات الوضوح المستعملة بتفاعل الكوثرة المتعدد.. وتستعمل في تحليل SNPs والتوابع Microsatellites .

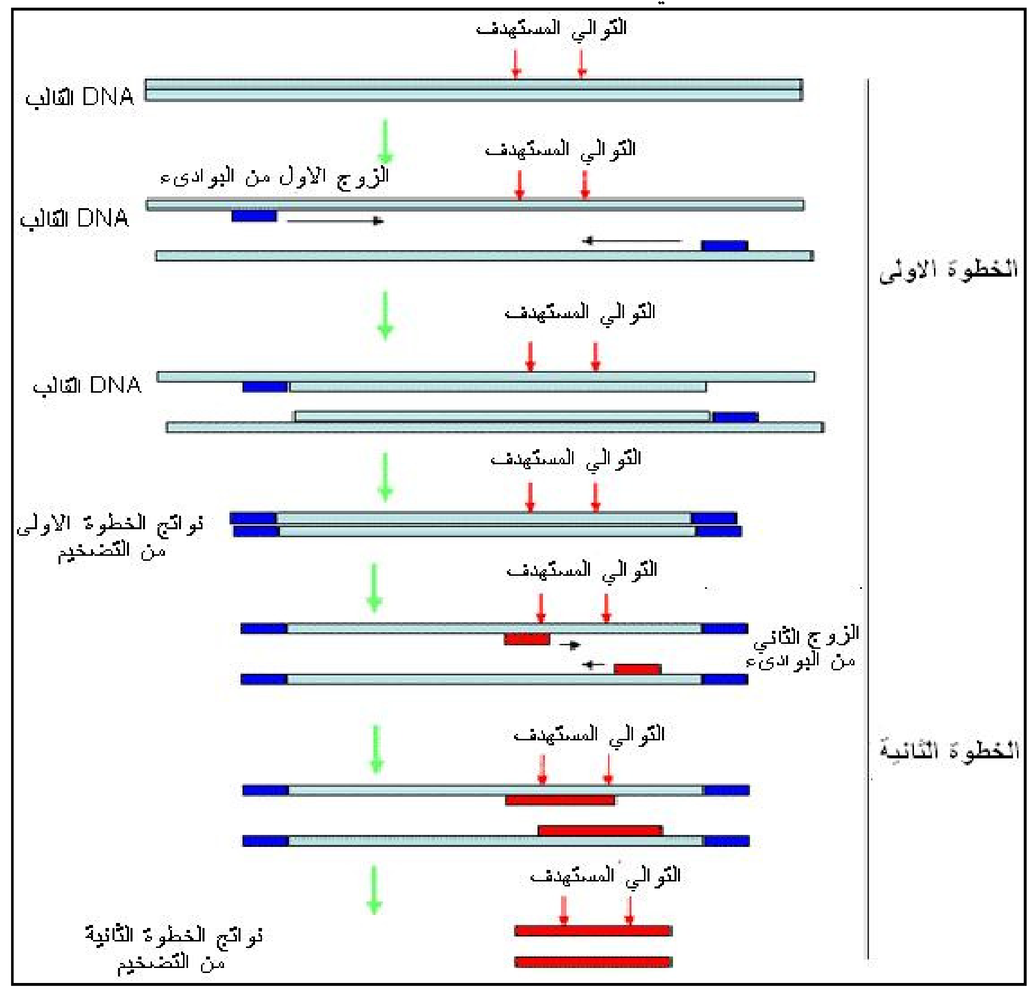
تضخيم العنقدة Nested PCR

عملية تضخيم لجزيئة DNA تساعد في تقليل الخلفية الناتجة من التضخيم غير المتخصص لجزيئات DNA . والطريقة تشبه طريقة الكوثرة الاعتيادية ولكن يستعمل فيها زوجين من البوادئ لتكبير قطعة ما ويكون على خطوتين :

1- تضخيم قطعة معينة من جزيئة DNA بطول يتعدى الطول المستهدف في النهاية

2- تضخيم منطقة تقع ضمن المنطقة التي تم تضخيمها في الخطوة الأولى ، وبذلك تكون نواتج التضخيم اقصر مما في الخطوة الأولى وتحتوي التوالي المستهدف فقط .

لذلك فان كانت النواتج في الخطوة الأولى قد تحمل أخطاء ، فمن المستبعد ان تكون الخطوة الثانية كذلك ، وبذا يكون تضخيم العنقدة عملية تضخيم متخصصة جدا . والعملية موضحة بالشكل التالي (شكل 4) .



شكل 4 : خطوات تفاعل كوثرة العنقدة

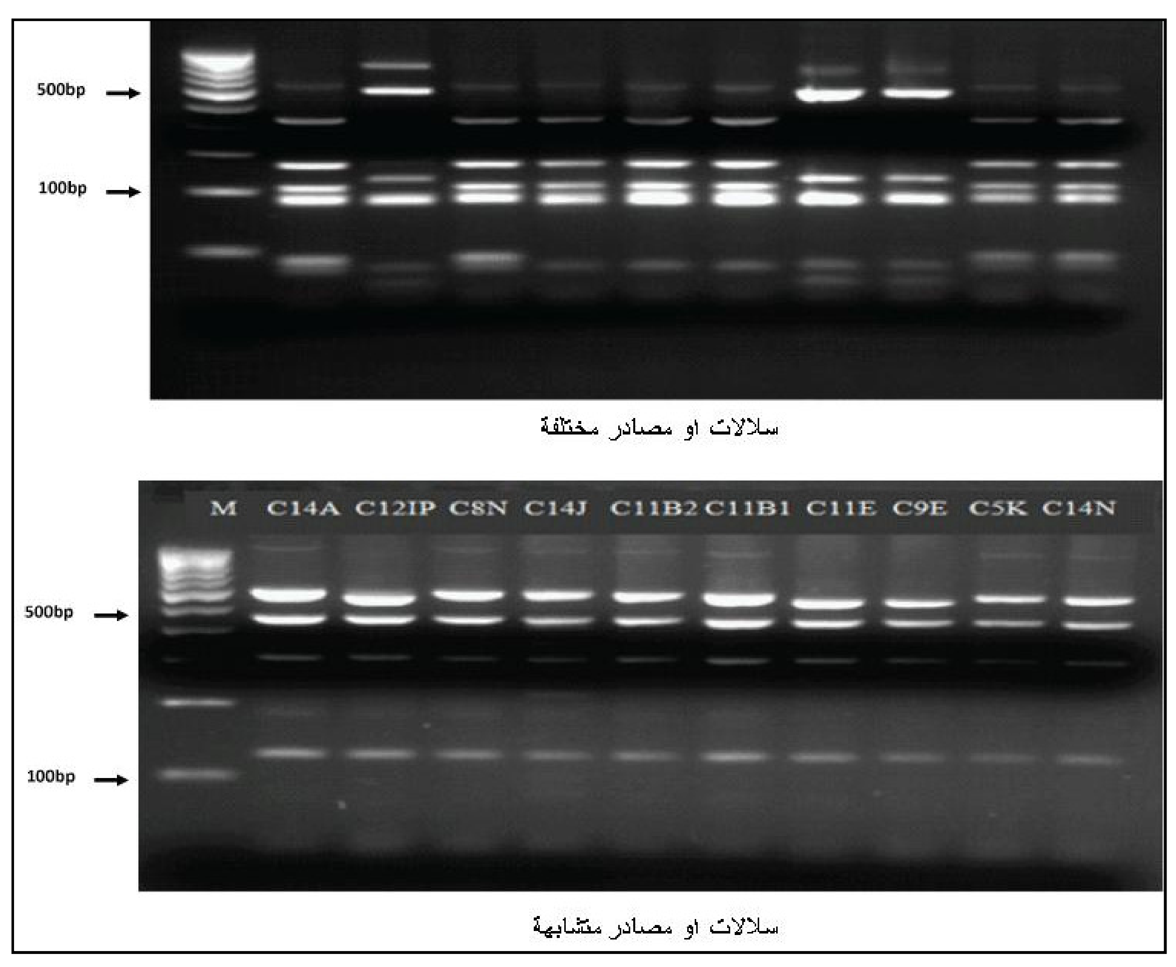
ويتضح من الشكل ان الطريقة تحتاج الى عمليتين منفصلة ، في الأولى ترتبط البوادئ (المجموعة الأولى) الى جانبي قطعة DNA المستهدفة ، ومجموعة البوادئ الثانية ترتبط الى نواتج الخطوة الأولى والتي تضخم بـ 20-30 دورة ، ثم يتم تضخيم القطع الداخلية (من نواتج الخطوة الأولى بـ 15 – 25 دورة) لذلك لا يتوقع ان تكون هنالك مواقع لارتباط البوادئ غير المتخصصة وبذا تضمن العملية الخلو من التلوث والنواتج غير المتخصصة ، ويفضل ان تكون مواقع ارتباط المجموعة الثانية تختلف بشكل كامل او جزئي عن تلك المستعملة في التفاعل الأول ويفضل ان تقع في الطرف '3 و ان يتم اختيارها بحيث لا تكون مزدوجات البوادئ . وتتوفر برامج خاصة لتصميم البوادئ لتضخيم العنقدة .
ويكون تضخيم العنقدة ناجح جدا في تضخيم قطع DNA الطويلة والتي تكون أكبر من قابلية الطريقة العادية ولكن تحتاج الى معرفة وتفاصيل أكثر عن التوالي والقطع . ويمكن ان تستعمل الطريقة في تضخيم الأهداف قليلة النسخ مثل اقل من 100 نسخة وكذلك عند إجراء الكوثرة لتحديد الكميات فضلا عن أهداف أخرى .
ويمكن ان تتم عملية تضخيم العنقدة في خليط التفاعل نفسه بدون تخفيف او تبديل مكونات التفاعل بين مرحلتي التضخيم على شرط زيادة الاهتمام بتصميم البوادئ لتجنب الازدواج الذاتي للبادئ او الازدواج بين البوادئ الداخلية والخارجية كما ذكر أعلاه .
وفي حالة التضخيم شبه المعنقد Seminested PCR فيصمم بادئ الخطوة الثانية لأحد نهايات التوالي المستهدف (والذي يكون عادة cDNA) سواء للطرف '3 او'5 عندما يراد تحديد سير الجين Gene walking كما في حالة Rapid amplification of cDNA ends (RACE) .

تفاعلات كوثرة النسخ العكسي Reverse transcription PCR (rt PCR)

تستعمل لغاية التعامل مع RNA لذلك يحول الأخير الى cDNA بإنزيم النسخ العكسي Reverse transcriptase فالتفاعل يمكن ان يقسم الى مرحلتين الأولى تفاعل الشريط الأول وفيه يتم نسخ mRNA الى DNA باستعمال Oligo dT كبادئ والذي يرتبط الى 3' poly A الموجودة في المنطقة غير القابلة للترجمة 3' UTR من جزيئة mRNA والتي تكون موجودة في معظم هذه الجزيئات ويكون الخليط حاويا على إنزيم النسخ العكسي و dNTPs وهذه تتم في دارئ خاص بإنزيم النسخ العكسي وتتم العملية في حوالي ساعة بدرجة حرارة 37° م . بعد ذلك يتم إضافة إنزيم RNase H الذي يهضم جزيئات RNA وبذا يفك RNA من مزدوجات RNA-cDNA .
والتفاعل الثاني والذي يطلق عليه تفاعل الشريط الثاني ويتمثل بعمليات تفاعل الكوثرة التي تحتاج الى بوادىء وإنزيم كوثرة DNA (DNA polymerase) وبعدها يتحول الشريط

المفرد (cDNA) الى شريط مزدوج وتسير عملية الكوثرة الى ان تصل الكميات الى حد يمكن الكشف عنها والطريقة مفيدة جدا في الكشف عن جزيئات RNA النادرة وتساعد في كلونة تواليات RNA على شكل DNA المكمل لها وتساعد في بناء مكتبات cDNA الحاوية تواليات mRNA للجينات المعبر عنها في الخلايا وتسجيل مستويات التعبير على مستوى RNA او البروتينات.
وتستعمل هذه الطريقة لأغراض عدة مثل تحديد نسق التعبيرExpression profiling وكذلك تحديد توالي نسخ RNA لمعرفة نقاط بدء الانتساخ Transcription او مواقع إنهاء الانتساخ ، وفي حالة معرفة توالي الجين يمكن تحديد مواقع الاكسونات والانترونات فيه ، وفي حالة معرفة الطرف 5` التي تشير الى موقع بدء الانتساخ فيمكن باستعمال الطريقة وإقرانها مع طريقة RACE المذكورة أعلاه .
وتستعمل الطريقة لتحديد كميات mRNA في نماذج صغيرة جدا حتى ولو كانت في خلية مفردة ، وتعد أفضل من التقنيات المستعملة لهذا الغرض من حيث الحساسية مثل طرق RNase protection assay ، Northern blot analysis ولذلك تستعمل في تحديد نسق التعبير الجيني مثل الجينات الخاصة بالجوانب المناعية على سبيل المثال .
وتستعمل الطريقة بعض الأحيان للتشخيص وتحديد حركة الخلايا الورمية الخبيثة أثناء ظاهرة الانبثاث Metastasis .

تفاعل الكوثرة العشوائي Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)
تفاعل كوثرة يطلق عليه أيضا Arbitrarily primed PCR (AP- PCR) ، تستعمل فيه بوادىء عشوائية قصيرة والتي يمكن ان تضخم مواقع عدة في جزيئة DNA ، وقد أمكن تطوير عددا من الواسمات التي تستعمل لأغراض مختلفة نتيجة للدراسات ضمن حقل البايولوجي الجزيئي . يكون طول البوادئ المستعملة بحدود 10 قواعد في العادة وتضخم كميات بالنانوغرام من DNA الجينومي بدرجات حرارة التحام واطئة باستعمال تفاعل الكوثرة والتي يصبح بالإمكان فصلها وتصبيغها ببروميد الاثيديوم .
ويتم إجراء عملية الكوثرة تحت ظروف غير صارمة لتضخيم قطع عشوائية من أي جينوم ، لذلك فان الأنواع القريبة من بعضها جينيا تظهر توزيع حزم متشابهة اما البعيدة عن بعضها فتكون حاوية على قطع بعيدة كما يظهر الشكل 5 .



شكل 5 : نمط الحزم التي تظهر من تفاعلات الكوثرة العشوائية

ان شيوع استعمال طريقة الكوثرة العادية هو لسهولتها ونجاحها العالي وتحتاج الى معرفة بالتوالي . ولكن باستعمال البوادئ العشوائية يمكن ان تضخم مواقع مختلفة في DNA وهذه مهدت لتطوير واسمات تستعمل لأغراض مختلفة وهي لا تحتاج الى معرفة التوالي . وباستعمال البوادئ القصيرة أمكن الحصول على نسق مختلفة من DNA .

وعند درجة الالتحام الملائمة أثناء دورات الكوثرة فان البوادئ ذات التواليات المختلفة ترتبط الى مواقع مختلفة من تواليات القالب المكملة لها وتنتج قطع مميزة اذا كانت هذه المواقع ضمن مدى التضخيم من حيث المسافة . والاختلاف في النيوكليوتيدات بين مجموعة قطع DNA القالب ستؤدي الى ظهور الحزم او غيابها وذلك لاختلاف مواقع ارتباط البوادئ .

و لعملية الكوثرة العشوائية تطبيقات كثيرة نظرا لرخصها و بساطتها ومن هذه التطبيقات وضع الخرائط الجينية . واستعمالها في دراسات Southern blotting لجزيئة DNA الجينومي . وتستعمل الطريقة لتضخيم القطع الصغيرة Sequence tag sites

(STS) وفي هذه الحالة تكون هناك حاجة ماسة لمعرفة التوالي لغرض تصميم البوادىء له .
وقد مكنت الكوثرة العشوائية من تحديد الواسمات ذات العلاقة ببعض الصفات المهمة دون الحاجة الى وضع خارطة كاملة للجينوم .
وفي وراثة العشائر والتطور Population genetics and evolution حالت بعض المعوقات في تطور هذا الجانب ، ولكن طريقة الكوثرة العشوائية ساعدت في تحسين هذا الجانب ووفرت طرق بسيطة لتحليل التغاير الوراثي على مستوى DNA و لكن الى مدى معين وذلك لان نتائجه توضح الواسمات السائدة لذا يكون تردد الأليلات قليل الدقة مقارنة بالطرق الأخرى مثل Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ولذا احتاجت الكوثرة العشوائية الى تحسين بعض المؤشرات وزيادة عدد النماذج . فضلا عن ان الحزم المختلفة والتي لها الحجم نفسه والتي تظهر من استعمال البوادىء نفسها احتاجت الى عمليات إحصائية معقدة وكبيرة والتي يمكن ان تحل مشاكل معرفة أفراد النوع الواحد المهاجرة وتفريقها عن الأنواع المتباعدة .
و تستعمل الطريقة في الدراسات التطورية وأثبتت نجاحها بعد تدعيمها بنتائج الدراسات التصنيفية الموجودة وكذلك استعمال Isoenzymes و RFLP . وتستعمل الطريقة للأغراض الجنائية وتحديد الأبوة وغيرها من الأغراض في هذا المجال . وتفاعلات الكوثرة العشوائية أكثر حساسية من تفاعلات الكوثرة الاعتيادية لذلك يكون من الصعوبة الحصول على نتائج متطابقة في كل مرة خاصة في الحزم الفاتحة وقد تكون هذه ناتجة من البوادئ او كون DNA القالب غير جيد فضلا عن ان تركيز DNA القالب يمكن ان يؤدي الى غياب او وجود بعض الحزم .
و بما ان الطريقة العشوائية يمكن ان تضخم أي قطعة من DNA لذلك فانها يمكن ان تضخم DNA الآتي من التلوث او الإصابات او الأحياء المتطفلة في نماذج DNA المستعملة لذلك كانت العناية الفائقة لازمة لإبعاد التلوث بجزيئات DNA غريبة آتية من مصادر خارجية . وبالرغم من مساوئ الطريقة العشوائية والواسمات التي تكشفها الا انها تكون مفيدة عند عدم توفر الإمكانات الأخرى .

طريقة الكوثرة الكمية Quantitative PCR (qPCR)

يطلق عليها تسميات مختلفة RQ-PCR ، RT-PCR ، QRT-PCR ، RT-QPCR . و تستعمل الطريقة لقياس نواتج الكوثرة الآني Real Time – PCR (التي سيأتي ذكرها لاحقا) .

والأفضل فيها هو قياسها كميات البدء لجزيئات DNA او RNA او cDNA وتستعمل لمعرفة فيما اذا كان توالي معين موجودا في النموذج وعدد نسخه . ويمكن ان تستعمل مع طريقة كوثرة النسخ العكسي Reverse transcriptase PCR كما ذكر آنفا . وتستعمل الطريقة في تضخيم وتحديد تواليات جزيئات DNA النادرة والغريبة .

تفاعل كوثرة الخلية المفردة Single cell PCR

تعمد الطريقة الى تضخيم الأهداف القليلة جدا كما في حالة المواد الوراثية الغريبة الموجودة في خلية مفردة . وعندها تتخذ الإجراءات اللازمة للتعامل مع هذه الكميات القليلة . تستعمل الطريقة في الفحوص قبل الولادة اذ يتم التحليل الوراثي باستعمال خلايا الجنين لتحديد الاضطرابات الوراثية المندلية على سبيل المثال ، وفي الوقت الحاضر تتوفر عدد خاصة للجينوم الكامل للخلايا المفردة .

تفاعل كوثرة الطور الصلب Solid – phase PCR

في هذه الحالة يعنى بتصميم البوادئ التي تكون تقييد على سطوح خاصة والمكملة لأهداف من DNA ذائبة وغير مقيدة وبعدها يتم إطالة البوادئ ، وبذا تكون في التفاعل نوع من التقيدات ولكن مع هذا تجد تطبيقات مهمة مثلا في تصميم وصناعة رقائق DNA (DNA chips) وكذلك في الكشف عن المرضات الميكروبية ، وكذلك تستعمل في تشخيص الأمراض ، ودراسة التنميط الجيني Genotyping والتعبير الجيني ، وكذلك تستعمل في التعرف على الطفرات التي قد تكون تافهة Nonsense mutations او الطفرات الخاطئة Missense mutations ، وقد يكون بالإمكان توسيع مدى استعمالات هذه الطريقة وفق الحاجة .

طريقة الكوثرة غير المتناظرة الحرارية Thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL PCR)

طريقة تستعمل لعزل وتقدير المناطق غير المعروفة التي تحيط او تجنح Flanking توالي معروف وذلك بمساعدة أزواج من بوادىء العنقدة وبدرجات حرارة التحام مختلفة . ويمكن استعمال البوادئ المشتتة Degenerated primers لتضخيم مناطق اتجاهات أخرى من التوالي غير المعروف .

طريقة كوثرة الهبوط Touchdown PCR (TD-PCR)

ويعني هنا الهبوط بدرجات حرارة الالتحام Annealing وهنالك نوع مشابه يسمى Step down PCR . وتمثل إحدى تفاعلات الكوثرة التقليدية والتي ترافقها بعض الأحيان ظهور نواتج غير متخصصة وبذلك فهي تؤثر في الخلفية غير المتخصصة .

وتتم باستعمال درجات حرارة التحام أعلى من الدرجة المثلى (واقل من درجة حرارة الانصهار) ، في الدورات المبكرة ثم يتم تخفيض الحرارة درجة واحدة او اقل (عادة يتم خفض الحرارة بمقدار نصف درجة مئوية لكل دورة) لحين الوصول الى درجة حرارة الالتحام المناسبة والتي تبقى ثابتة لكل الدورات اللاحقة (وأحيانا تخفض درجة حرارة الالتحام اقل من الحرارة المناسبة في دورات العشر الأخيرة للحصول على كمية منتج PCR كبيرة) . لذلك تسمح هذه الطريقة بعمل نسخ كثيرة من جزيئات DNA المرغوبة عن طريق السماح للبوادىء للارتباط بمناطق DNA الأكثر تكاملا معها فقط في الدورات الأولى من تفاعل الكوثرة .

اما طريقة Step down PCR فتختلف عن Touchdown PCR بان حرارة الالتحام تكون ثابتة وأعلى من حرارة الالتحام المناسبة في الدورات الأولى ولا تخفض تدريجيا وإنما تخفض مباشرة عددا من الدرجات المئوية للدورات اللاحقة حتى يكتمل تفاعل الكوثرة .

تنفع هذه الطريقة لتقليل الزمن والجهد والكلفة اللازمة لإيجاد الظروف المثلى لتفاعل الكوثرة ، حيث تختصر العمليات السابقة بخطوة بواحدة .

ويتضح مما ذكر أعلاه ان الطريقة ما هي الا أمثلة وإيجاد الظروف المثلى لعملية التضخيم ، فبدلا من استعمال أنابيب تفاعل متعددة وتراكيز مختلفة من المواد او غيرها من اللوازم ، يكون بالإمكان في أنبوب او وعاء واحد او مجموعة صغيرة من الأوعية حدوث التفاعلات لتضخيم الهدف المطلوب للتخلص من المتضخمات Amplicons الخاطئة ، وتكوين مزدوجات البوادئ .

وفي الأجهزة الحديثة يتم برمجة الدورات بحيث تكون وصلة الالتحام في الدورات المتعاقبة تتم بدرجات حرارية مختلفة ، ولذا يتم اختيارها وفق درجة الانصهار ، ثم تخفض تدريجيا الى ان تصل الى اقل من حرارة الالتحام ، وفي هذه الحالة يتم ضمان ان التفاعلات الأولى من الالتحام تتم بين المتفاعلات التي يكون فيها التكامل عاليا أي التي تعطي الهدف المراد تضخيمه . وانخفاض الحرارة في الدورات الأخيرة قد تشجع الالتحام غير المتخصص لكن عندها يكون الهدف قد تضخم الى حد كبير بحيث ان التفاعلات غير المتخصصة في الدورات الأخيرة سوف يلغيها الهدف المتضخم .

و بما ان الغرض من الطريقة هو منع الالتحام غير المتخصص في الدورات المبكرة لذا يكون من الأفضل البدء بدرجات حرارية عالية أي استعمال طريقة البدء الساخنة Hot-start PCR مع هذه الطريقة ، وهذا يزيد من تخصصية تفاعل الكوثرة بشكل كبير جدا .
و تكون طريقة كوثرة الهبوط ذات فائدة عند عدم معرفة التطابق Identity بين البادئ والقالب خاصة عندما يتم تصميم البوادئ بالاعتماد على تواليات الحوامض الامينية ، فعدم التطابق هذا قد يؤدي الى تقليل درجات الانصهار للقطعة المستهدفة بما فيه الكفاية لتكوين حزم غير مرغوب فيها . وبذلك فان الطريقة تيسر استعمال البوادئ المشتتة التي فيها تغاير في القواعد ووجود Inosine وحتى عندما يكون هناك عدم تلاؤم Mismatch قرب النهاية '3 أي ان الطريقة تستوعب عدم التلاؤم هذا ولكن يفضل ان تكون الظروف الأخرى ملائمة جدا مثل استعمال دواريء ملائمة .

كوثرة المناطق المتغايرة VNTR-PCR

يتم فيها تضخيم مناطق خاصة مثل VNTR او STRs لتحديد البصمة الوراثية للأحياء وبناء قواعد بيانات مثل CODIS . التي تستعمل عادة في الأغراض الجنائية ، ويستخدم mtDNA بشكل أساسي ، ويتم البحث عادة عن STRs التي تقارن بالمراجع الموجودة في قواعد البيانات ، ويمكن ان تستبدل عند الحاجة بمصادر أخرى مثل كروموسوم الجنس Y او غيرها من المصادر للمقارنة .

الفصل الثاني	
مقومات وأساسيات تفاعل الكوثرة	
الهدف او القالب **Target DNA**	
الواسمات **Ladder markers**	
المحاليل الدارئة **Buffer solutions**	
النيوكليوتيدات **dNTPs**	
الايونات ثنائية التكافؤ	
الإنزيمات	

مقومات وأساسيات تفاعل الكوثرة

يتناول هذا الجزء المقومات والمواد المتفاعلة في تفاعل الكوثرة . وبما ان تفاعلات الكوثرة محاكاة لتضاعف DNA داخل الأنظمة الحية وتتم عادة خارجها فهذا يتطلب تغير ظروف عدة للوصول في النهاية الى كوثرة قطع معينة من DNA الى كميات كافية لإجراء الدراسات والتحليلات عليها . وبما ان الظروف داخل الأنظمة الحية تختلف تماما عن الظروف خارج الأنظمة الحية فقد تطلب هذا العناية بمختلف الجوانب التي لا يكون لها وجود داخل الأنظمة الحية وعلى سبيل المثال لا الحصر النظام الحراري الذي يجب ان يتغير خارج الأنظمة الحية في حين ان عملية التضاعف تتم بدرجة حرارية واحدة داخل الأنظمة الحية ، وتحدث بمدى معين من التضخيم لتلاءم حاجة النظام الحي . فضلا عن وجوب توفير داريء ليلاءم الفعاليات الإنزيمية .

الهدف او القالب Target DNA

يستعمل تفاعل الكوثرة لتضخيم أهداف مختلفة في العادة تكون مجنحة بتواليات معروفة التوالي مثل الموجود بالشكل الآتي (شكل 6)



شكل 6 : التواليات المحيطة بالتوالي المستهدف والتي تصمم البواديء لتكملها

وهذه الأهداف اما تكون أشرطة مزدوجة لجزيئة DNA (dsDNA) او أشرطة مفردة منه ssDNA او أشرطة RNA التي تحتاج الى النسخ العكسي . و قد تكون هذه جينات كاملة او جزء من الجين او تواليات غير مشفرة Non-coding sequences قد تصل أحجامه الى 10 كيلو قاعدة (Kb) والبعض الآخر قد يصل الى 40 كيلوقاعدة بعد اتخاذ الإجراءات اللازمة . وعادة يميل العاملون عند تحضير النماذج الى البحث عن المصادر الوفيرة لجزيئات DNA والثابتة ، فمثلا في الطب الجنائي يفضل استعمال DNA المايتوكوندريا (mtDNA))لأنه يوجد بكثرة في الخلايا فضلا عن ثبوته وفي جميع الأحوال يكون الغرض من العملية هو الذي يحدد المصدر بالتعاون مع ظروف مؤثرة أخرى .

وبطبيعة الحال فان جزءاً من نجاح عملية الكوثرة تعتمد على جودة او نقاوة DNA المستهدف ومن أهم شروطها عدم احتوائها على مثبطات لإنزيم الكوثرة DNA polymerase ، وهذا يعني ان عملية الكوثرة PCR تستعمل DNA كهدف للتضخيم نظرا لثبوت هذه الجزيئات وسهولة عزلها .

ويمكن الحصول على الأهداف (DNA) من نماذج مختلفة مثل استعمال عيدان تنظيف الأسنان للحصول على الخلايا من تحت الأظافر او استعمال مسحات قطنية للحصول على الخلايا من بطانة الفم او من خلايا بصيلات الشعر . اما اذا كانت الخلايا من مزارع الأحياء المجهرية مثل البكتريا المعلقة في وسط غذائي ، فتفصل الخلايا بالطرد المركزي بسرعة 1200–1500 xg لمدة خمس دقائق ثم تعلق في 1 مللتر من داريء الفوسفات الملحي (Phosphate buffered saline) ثم يعاد فصلها بالسرعة والوقت ذاته ، وتكون عملية الغسل ضرورية لإزالة الوسط الغذائي والعوامل المثبطة من سطوح الخلايا فضلا عن ان حطام الخلايا Debris يمكن ان يثبط عملية الكوثرة وعند حصول ذلك لابد من تخفيف النموذج المستعمل ، وعلى العموم فان الخلايا المغسولة تعلق في 20 مايكرولتر من الماء المقطر او أي محلول آخر ملائم ، لتجري عليها الخطوات الأخرى .

وفي حالة البحث عن البكتريا من النماذج الطبيعية فتؤخذ عيدان تنظيف الأسنان للحصول على البكتريا من الأسنان ، او تؤخذ مسحات قطنية للحصول على البكتريا من الحنجرة والأذن او القدم او أي موقع اخر من الجسم وتعلق في 500 مايكرولتر من الماء ، ثم يعرض النموذج لدورات من التجميد والانصهار لتكسير جدران الخلايا البكترية وبالرغم من هذا فان DNA الموجود في الخلايا لا ينطلق معظمه ، ولكن ما يمكن الحصول عليه يكون كافيا لإجراء تفاعلات الكوثرة .

اما عند استعمال RNA للتضخيم فانه يجب ان يعرض للنسخ العكسي مثل استعمال MuLv المستخرج من الفيروسات او rTth المحور من إنزيم الكوثرة لتحضير أول شريط من cDNA قبل البدء بتفاعل الكوثرة التقليدي ، وفي نماذج RNA ذات المحتوى العالي من G+C او الحاوي على تراكيب ثانوية معقدة فاستعمال rTth المذكور آنفا يكون أفضل .

بعد الحصول على نماذج DNA فان من أهم مواصفات نجاحه هو احتوائه على الأقل على شريط من DNA حاوي على المنطقة المراد تضخيمها وان الشوائب يمكن ان تخفف دون التأثير في خطوات التضخيم وأفضل التخافيف المستعملة 5:1 لمصدر DNA مع الماء ، وعملية التخفيف هذه تكون للتخلص من الشوائب الموجودة في مصدر الهدف وكذلك الشوائب والمواد المستعملة أثناء الاستخلاص والتنقية .

وعند استعمال DNA كنموذج نقي لبدء التفاعل فان الكميات يجب ان تكون في المقياس النانوي (Nanogram) و يمكن ان تصل قياس مايكروغرام (Microgram) في حالة استعمال DNA جينومي (Genomic DNA (gDNA ، وهذه الكميات او التخافيف يمكن ان تحدد بالتجربة اذ لا يوجد تعميم لها نظرا لاختلاف النماذج . وكما ذكر أعلاه فان النموذج يجب ان يكون خاليا من مثبطات إنزيم الكوثرة ، ولزيادة الاحتياط وبعد تحضير النماذج تسخن بأي وسيلة كانت لدرجة 95º م او وضعها في ماء مغلي لمدة خمس دقائق وذلك لتثبيط جزيئات DNase الموجودة في النماذج و ذلك لان بقاء الإنزيم في النموذج سيؤدي الى تدمير جزيئات DNA القالب الى قطع لا تكون ملائمة لعملية PCR .
اما في حالة توقع ان تكون كميات DNA قليلة في النموذج لذا يجب ان تركز بالترسيب بالكحول الاثيلي ثم تبخير الكحول وبذلك يكون النموذج جاهزا لعملية الكوثرة التي يفضل ان تجري بأكثر من مكرر لزيادة الاحتياط .
اما كمية DNA المستعملة في تفاعل الكوثرة فتعتمد على الغرض من التجربة والترحيل الكهربائي لها ، فيمكن ان يكون الغرض التأكد من وجود جزيئات DNA في النموذج او لا ، وعلى العموم فأن الحزم الواضحة تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية بعد التصبيغ ببروميد الاثيديوم EthBr تكون حاوية على حوالي 20 نانوغرام ولذلك يؤخذ بنظر الاعتبار هذا المقياس عندما يراد التعامل مع مكونات الحزمة وتقطيعها بإنزيمات القطع .
وعليه تتراوح الكميات بين تطرف الزيادة أو النقصان ، فعند زيادة كمية DNA فإنها حالة غير مرغوب فيها ، فهي يمكن ان تتحرك بسرعة وتظهر بانها اقل من الوزن الحقيقي لها وفي بعض الحالات يمكن ان تؤدي الى إرباك المجال الكهربائي لحزم أخرى في المسارات الموازية مظهرة إياها بحجم خاطئ ، اما عند قلة التركيز فان القطع الصغيرة تظهر حزم باهتة يصعب رؤيتها. ولكن في العموم فان مدى واسع من التراكيز يمكن ان تتحمله عملية الكوثرة لإعطاء نتائج مقبولة .
والتوجه العام للحجوم المستعملة لنماذج DNA هو استعمال 10-20 مايكرولتر يضاف الى خليط تفاعل بحجم 50 مايكرولتر . وعندما يراد الحصول على كميات كبيرة من جزيئات DNA فلا يتعدى الحجم 50 مايكرولتر وإنما يصار الى استعمال مكررات كثيرة بالحجم نفسه .

الواسمات Ladder markers

وتلحق هذه بموضوع DNA ويطلق عليها ايضا الدلائل الحجمية ، هي قطع معروفة الوزن الجزيئي تستعمل في تحديد الوزن الجزيئي لنواتج الكوثرة . وقديما كانت تستعمل

العاثيات البكترية Bacteriophages لهذا الغرض بعد تقطيعها بإنزيمات قطع خاصة مثل λ Hind III أو λ Pst I او قطع ΦX 174 المهضومة بـــ HaeIII . وهذه الواسمات تعطي حجم او وزن جزيئي تقريبي ، ويتم اختيارها لتكون ملائمة للنماذج تحت الدراسة ، فمثلا لنماذج الكوثرة الصغيرة تستعمل ΦX 174 HaeIII ، وللقطع الكبيرة مثل 6 كيلو قاعدة يستعمل λ Hind III .

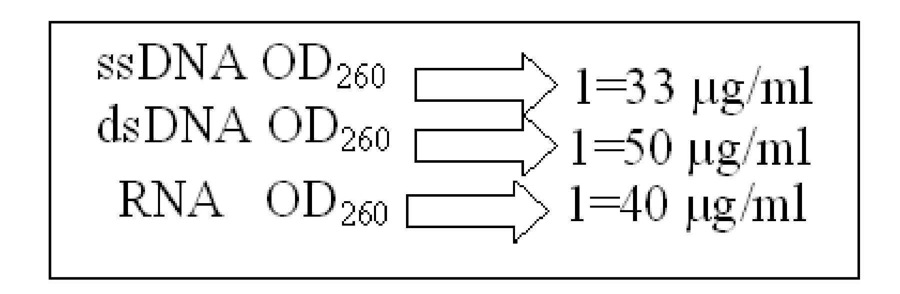
وفي الوقت الحاضر انبرت الشركات في تحضير سلم من الواسمات بأوزان جزيئية مختلفة تتراوح بين 100 قاعدة وبعضها يصل الى 10 كيلو قاعدة .

وفي حالة معرفة كميات DNA في مسار Lane الواسمات يمكن حساب كمية DNA التقريبية للحزم الواضحة ، وفي هذه الحالة يمكن الاستعانة ببرامج الحاسوب الكثيرة المعنية بتحليل الهلام . ويفضل ان يكون خليط الواسمات جاهزا ومخلوط مع دارئ التحميل Loading buffer وبتركيز محدد ، وعادة يستعمل في أول مسار من مسارات الهلام ، والأفضل استعمال أكثر من مسار للواسمات في الهلام لزيادة دقة النتائج .

تراكيز جزيئات DNA و حساباتها

بما ان DNA هو احد المتفاعلات سواء على شكل قالب او كونه أهم نواتج تفاعل الكوثرة وكذلك أولياته من dNTPs . وهي بصورة عامة تحسب بقياس OD_{260} (A_{260}) . وهذه بعض الحقائق حول أوزان وتراكيز هذه المواد المهمة .

معدل الوزن الجزيئي لجزيئات dNTPs هو 487 دالتون اما نظيرتها dNMP فهو 325 دالتون وهي التي تدخل في تركيب DNA .



وحساب الامتصاص يكون وفق المعادلة :

Absorbance = Molar Extinction Coefficient × Conc. × Path length

فكل قاعدة من قواعد النيوكليوتيدات لها Molar Extinction Coefficient خاص

Extention coeffecient	الطول الموجي (نانومتر)	القاعدة النتروجينية
12300–13400	260–264	Adenine
7350–8100	273–275	Guanine
6100–10200	267–274	Cytosine
8200	259	Uracil
7900	264	Thymine

اما طول الممر Path length فعادة يكون في Cuvette 1 سم

فمثلا لبادئ بطول 20 قاعدة (20 mer) تكون

$$A_{260}=1=5\ nmol= 33\ \mu g/(20 \times 325)$$

ولتحويل بيكومول pmol الى مايكروغرام µg من البادئ بطول 20 قاعدة يكون كالآتي :

$$0.065\ \mu g = 1.000.000\ /(325 \times 20 \times 10\ )$$

و لتحويل مايكروغرام من البادئ الى بيكومول مثلا 0.1 مايكروغرام من بادئ بطول 20 قاعدة :

$$0.1 \times 1,000,000\ /(20 \times 325) = 15.4\ pmol$$

و لحساب تركيز البادئ للتفاعل بالبيكومول / مايكرولتر

20 pmol of primer in 100 µl reaction volume = 0.2 µM

المحاليل الدارئة Buffer solutions

تستعمل لتصحيح والمحافظة على الرقم الهيدروجيني وتركيز الأيونات الموجبة بحيث تكون بتراكيز تسمح لإنزيمات الكوثرة بالفعالية ، اذ ان الرقم الهيدروجيني المرتفع جداً او المنخفض جداً يؤدي الى تثبيط تفاعلات الكوثرة واستعمالها يعتمد على عدد من الظروف أهمها الغرض من التفاعل . وهناك اكثر من محلول دارئ كل يستعمل لغرض محدد في مرحلة من عمليات التضخيم ، وتكون محتوياتها مختلفة وتعدل أرقامها الهيدروجينية اما باستعمال حامض الهيدروكلوريك HCl او هيدروكسيد الصوديوم NaOH . وفي مجال تفاعل الكوثرة الذي يكون منصبا أساسا لاستعمال DNA توفر الشركات الدوارئ الخاصة و تكون عادة بتركيز 10X والبعض منها يكون خاص بتفاعل إنزيم Taq كما سيأتي ذكره لاحقا ومن هذه الدوارئ :

داريء الكوثرة PCR buffer

داريء يحتوي على ايون البوتاسيوم بشكل أساسي . يجهز بتركيز 10X ومكوناته :

500 mM KCl

100 mM Tris pH 8.3 -9

ويضاف اليه Triton-X بنسبة1٪ ، وبعض الأحيان يضاف الجيلاتين بنسبة 0.01٪ (وزن\حجم) .

ويمكن ان يسوق بهذه الصيغة ، او يضاف اليه كلوريد المغنسيوم بتركيز 15 ملي مول . والتراكيز النهائية لهذه المواد في خليط التفاعل تكون 50 ملي مول من البوتاسيوم (وهي تتخذ كقيمة أساسية Default في العديد من برامج الحاسوب والحاسبات الخاصة بتفاعلات الكوثرة). اما تركيز Tris فيكون 10 ملي مول . وفي حالة احتواء الداريء على المغنسيوم فان التركيز النهائي سيكون 1.5. ملي مول .

داريء TE

داريء Tris-EDTA يحتوي على Tris-HCl و EDTA ، يحضر بتركيز عالي مثل 10X ثم يخفف عند الاستعمال ولتحضير لتر من الداريء بتركيز 10X :

Tris-HCl (1M) يستعمل منه 100 مللتر

0.5 M EDTA (pH 8) يستعمل منه 20 مللتر

ويضاف 880 مللتر من الماء المقطر المزال منه الأيونات Deionized distilled water (ddH2O) .

ويكون تركيز المواد في المحلول النهائي Tris- HCl 100 mM وتركيز EDTA 10 mM .

ولتحضير تركيز 1X تستعمل عشر (1\10) الكميات المذكورة أعلاه مع استعمال 998 مللتر من الماء المقطر (ddH2O) ليكون تركيز Tris- HCl 10 ملي مول و EDTA 1 ملي مول .

ويحضر الداريء بأرقام هيدروجينية مختلفة اعتمادا على الغرض من استعماله ، و يتم ذلك بعد إذابة Tris-base الذي يعدل رقمها الهيدروجيني باستعمال حامض الهيدروكلوريك (HCl) . ومن الأغراض هذه خزن نماذج DNA لذلك يحضر الداريء برقم هيدروجيني 8 للتقليل من حالة إزالة البيورينات Depurination التي تحصل في الوسط الحامضي . اما عند خزن RNA فيكون الرقم الهيدروجيني 7.5 وذلك لانه جزيئات RNA تتفكك في الوسط القاعدي التفاعل . فضلا عن ان مادة EDTA تقلل من الأيونات اللازمة لفعاليات الإنزيمات القاطعة التي توجد في النموذج وبذلك تستعمل في للخزن والحفاظ على الحوامض النووية . ولكن في الوقت نفسه تكون الأيونات مثل Mg^{++} ضرورية لعمل إنزيمات الكوثرة لذلك وكأحد المعالجات لهذه الحالة لا يستعمل الداريء في التخفيف وإنما يستعاض عنه بالماء المقطر .

اما العمليات التي تجري بعد تفاعل الكوثرة Downstream processing فلا تتأثر بشكل كبير باختلاف الأرقام الهيدروجينية .

وفي جميع الأحوال وللدوارئ الحاوية على EDTA فان هذه المادة تعمل على خلب الأيونات ثنائية التكافؤ مثل Mg^{++} وغيرها التي تكون ضرورية للعديد من الإنزيمات مثل إنزيمات القطع Nucleases او إنزيمات الكوثرة . وتكون سعة المادة للخلب هي جزيئة من EDTA ترتبط بأيون واحد من الأيونات ثنائية التكافؤ . وبذلك فان وجودها بتراكيز عالية يؤدي الى خلب الأيونات الضرورية لإنزيمات الكوثرة اللازمة لمضاعفة DNA ، وعليه تتخذ الاحتياطات اللازمة لتوفير الأيونات ثنائية التكافؤ مثلا استعمال الماء المقطر بدلا من استعمال الدوارئ الحاوية على EDTA .

دارئ الخلات Tris – acetate EDTA buffer (TAE)

محلول دارئ يحوي خليط من Tris-base وحامض الخليك و EDTA ، ويستعمل في فصل الحوامض النووية DNA و RNA عند الترحيل في هلام الاكاروز Agarose gel ، يحضر المحلول الخزين منه مثلا بتركيز 50X من الآتي :

242 Tris base غرام في الماء

ويضاف اليه حامض الخليك الثلجي Glacial acetic acid بمقدار 57.1 مللتر

ثم يضاف اليه 100 مللتر من محلول EDTA بتركيز 0.5 مولار (pH 8) ويكمل الحجم الى لتر واحد .

ويخفف أيضا الى 1X بالماء (50:1) ويكون الناتج حاويا على 40 ملي مول Tris و 20 ملي مول حامض الخليك و 1 ملي مول EDTA .

والمحلول الخزين يمكن ان يبقى لمدة طويلة دون الحاجة الى تعقيم .

تكون جزيئات DNA في هذا الدارئ في حالة أفضل لأنه قاعدي التفاعل وبذا يتم تجنب إزالة البيورينات . والدارئ يحوي على كمية من Tris هي نصف الكمية في دارئ البورات TBE وله سعة دارئة Buffering capacity اقل و لكن يعطي نواتج أفضل ويستعمل الدارئ في عملية تحضير هلام الاكاروز وكذلك في عملية الترحيل الكهربائي Running buffer ، ويستعمل أيضا في حالة إجراء الترحيل الكهربائي تحت ظروف المسخ Denaturing gradient gel electrophoresis لإجراء التحليلات الواسعة للطفرات . وللدارئ مزايا حسنة في التطبيقات الإنزيمية اللاحقة لنماذج DNA مثل إجراء عملية كلونة نواتج PCR في حين لا تكون كذلك في حالة TBE . وكلفته اقل من دارئ TBE ويعمل بشكل جيد مع الترحيل الكهربائي القصير والتيار المنخفض فضلا عن ان DNA يتحرك فيه بسرعة .

دارئ البورات (TBE) Tris-borate EDTA

دارئ يستعمل بكثرة في كوثرة DNA مع TAE ولتحضير لتر من TBE بتركيز 10X يستعمل الآتي :

108 غرام من Tris base

55 غرام من حامض البوريك Boric acid

40 مللتر من محلول 0.5 مول EDTA (pH 8) .

يستعمل الدارئ في الترحيل وكذلك تحضير هلام الاكاروز . ونظرا لاحتوائه على كميات من Tris تصل الى ضعف الكميات المستعملة في TAE لذلك تكون سعته الدارئة أفضل و يوصى به في الترحيل الكهربائي عند استعمال تيار كهربائي عالي او الترحيل لمدة طويلة ، ويمكن استعماله بتركيز 0.5X كبديل لدارئ TAE (1X) لأنه يكون مساويا له من حيث سعة الدارئ ، وجزيئات DNA تتحرك بشكل أسرع مما في TAE مما يؤدي الى اختصار الوقت كما ذكر آنفا . فضلا عن انه أعلى كلفة من TAE .

ومادة البورات Borate تجعل الهلام أكثر صلادة وبذلك يسهل التعامل معه وتداوله وبذا يمكن تطبيق فولتية عالية دون ان يؤدي ذلك الى انصهار الهلام وبالتالي الحصول على النتائج بوقت اقصر. ولكن استعماله لا يحبذ في حالة كون النواتج ستستعمل لأغراض أخرى ، فالدارئ يثبط فعالية إنزيم Ligase وغيره من الإنزيمات ، وصفة تثبيط الإنزيمات بواسطة TBE تكون شائعة ومفضلة في بعض الأحيان فهي تحافظ على قطع DNA سليمة أثناء الإعداد ، ومن جهة ثانية ان نسبة عالية من عمليات الكوثرة تهدف الى تحديد حجم جزيئات DNA ، ومن النواحي الأخرى فان البورات يمكن ان تتجمع وتتداخل مع مجاميع RNA .

مادة اثيلين ثنائي الأمين رباعي حامض الخليك (EDTA) والأيونات ثنائية التكافؤ

تعمل مادة EDTA كمادة خالبة للأيونات ثنائية التكافؤ وبشكل خاص Mg^{++} الضروري لفعالية عدد من الإنزيمات بما فيها الإنزيمات القاطعة الملوثة ، لذلك تضاف الى الدوارئ لحماية الحوامض النووية من التفكك الإنزيمي ، وكذلك تكون الأيونات ضرورية لعدد من الإنزيمات المحورة وإنزيمات كوثرة DNA ، ولذلك تتم المحافظة على تركيز EDTA في الدوارئ لغرض الحفاظ على تركيز الأيونات مثل Mg^{++} ويكون ذلك بالأخذ بنظر الاعتبار ان كل جزيئة من EDTA ترتبط بأيون واحد من Mg^{++} . ويكون تركيز أيون المغنسيوم من أهم اضطرابات عملية الكوثرة ويعد الأسهل في التغير لتعديل الاضطرابات ، والشركات في الوقت الحاضر تزود بمحلول $MgCl_2$ بشكل منفصل عن بقية مكونات الداريء لتسهيل ضبط التركيز ، ويمكن البدء بسلسة من التراكيز تبدأ من 0.5 ملي مول وزيادة التركيز بـ

0.5 ملي مول الى حين الوصول الى 5 ملي مول وعند الوصول الى درجة مقنعة من جودة التفاعل يتم تضييق مدى التراكيز بزيادة 0.2 او 0.3 ملي مول للوصول الى أفضل تفاعل

.

داريء بورات الليثيوم Lithium borate buffer

داريء يمكن ان يستعمل في الترحيل الكهربائي وخاصة لفصل DNA و RNA . يتكون من بورات الليثيوم وذلك بخلط الليثيوم مع حامض البوريك . يمتاز الداريء بتوصيل كهربائي رديء ولذا يمكن ان يستعمل مع فولتية عالية تصل الى 35 فولت \ سم (في حين ان الفولتية العادية تكون بحدود 5 فولت / سم كما سيأتي ذكره فيما بعد) دون توليد الحرارة عند ارتفاع الفولتية . وبهذا فان وقت الترحيل سيختصر جدا مقارنةً بالحالات العادية . يكون الداريء غير فعال في إظهار ووضوح Resolution القطع الأكبر من 5 كيلو قاعدة ، ولكن حساس للتمييز التغير الحاصل في قاعدة واحدة على هلام اكروز عالي التركيز مثل 3٪ للقطع الصغيرة . ويمكن إجراء العمليات الإضافية بعد الفصل عن الهلام بشكل عادي . والدارئ القريب منه هو داريء بورات الصوديوم وهذا له ميزات بورات الليثيوم الجيدة فضلا عن قلة كلفته ، ولكن بورات الليثيوم يسمح باستعمال فولتية عالية نظرا لقابلية التوصيل المنخفضة لايون الليثيوم مقارنة بايونات الصوديوم .

داريء التحميل Loading buffer

داريء يستعمل لإعطاء لون للنموذج لتسهيل متابعته وكذلك زيادة كثافته لتسهيل وضعه واستقراره في الحفر . ومن الصبغات المستعملة في هذا الداريء (BPB) Bromophenol Blue ذات لون ازرق وصبغة Xylene cyanol ذات لون الأخضر المزرق وصبغة Orange G ذات لون برتقالي . اما المواد التي تزيد من الكثافة المستعملة مثل الكليسرول او السكروز او Ficoll لجعل النموذج يغطس ويستقر في قعر الحفرة . والصبغات المستعملة تكون ذات شحنات سالبة عندما تكون في داريء قريب من التعادل ، وبما انها ذات شحنة سالبة فهي تتحرك باتجاه حركة DNA أثناء الترحيل الكهربائي ولكن تختلف سرعة حركة وفق نظام الداريء المستعمل وفي العموم تكون مواصفات الصبغات كالآتي :

- Xylene cyanol (light blue, 4000 bp)
- Cresol Red (red, 1000 bp)
- Bromophenol blue (dark blue, 400 bp)
- Orange G (orange, 50 bp)

. فمثلا عند استعمال هلام اكروز 1٪ فان الصبغة البرتقالية Orange G تتحرك بشكل مكافئ لقطعة حجمها 40 قاعدة في TBE (1X) ، في حين تكافئ حركة قطعة بحجم 60 قاعدة في TAE (1X) ، اما BPB فتتحرك بما يكافئ حركة قطعة DNA مكونة من 200–400 قاعدة واذا كان البحث عن قطع بهذا الحجم فيجب تجنب استعمال هذه الصبغة لانها تجعل الحزم الصغيرة غير واضحة . اما الصبغ الخضراء المزرقة Xylene cyanol فتتحرك بكفاءة حركة قطعة مكونة من 500 قاعدة في TBE (1X) وتختلف قليلا في (1X) TAE لذا لا تستعمل مع قطع بهذا الحجم . ولتحضير داريء عام يستعمل

25 ملغم من صبغة BPB او Xylene cyanol

4 غم سكروز

10 مللتر ماء مقطر

وتخزن بحرارة 4 °م لمنع نمو الاعفان على السكروز او الكليسرول ويمكن ان تستعمل لمدة طويلة جدا .

ومن الصبغات الأخرى Cresol red التي تتحرك بسرعة مكافئة لجزيئة DNA بطول 125 قاعدة ، اما Orange G فتتحرك بسرعة قطعة مكونة من 50 قاعدة .

وتخلط دواريء التحميل بكميات مناسبة مثل استعمال 4 مايكرولتر مع حجم نموذج 10 مايكرولتر قبل وضعها في الحفر . ويقطع التيار عند وصول صبغة BPB الى ثلاثة أرباع طول الهلام ، وفي حالة الصبغة البرتقالية Orange G يقطع عندما تصل الى أربعة أخماس طول الهلام .

النيوكليوتيدات dNTPs

تعد النيوكليوتيدات احد أساسات نجاح تفاعل الكوثرة فهي تمثل وحدات البناء التي تضاف عند إطالة البادىء لتصطف وتربط بفعل إنزيمات الكوثرة وبتطابق مع إرشادات DNA القالب المراد تضخمه ، وهي تشمل dATP، dCTP، dGTP،dTTP وتخليقها لا يزال مقتصرا على العاملين المهرة في الكيمياء العضوية ، ولكن في الوقت الحاضر ظهرت أجهزة لتخليقها Oligonucleotide synthesizers للتقليل من تكاليف عملية التخليق . تجهز عادة مع العدد بشكل مجفد Lyophilized لغرض الحفاظ على ثبوتها . واذا كانت بشكل مسحوق فانه يكون متطايرا لذا ينصح بترسيبها قبل فتح الأوعية الحاوي عليها .

تحل هذه المساحيق في داريء TE او الماء المقطر الى التركيز المطلوب مثل 100 مايكرومول ، وتكون طريقة مزجها بالرج الشديد باستعمال جهاز الخلط Vortex ولا تذاب بعملية المص المتكرر لانه قد يؤدي الى التلوث ، والنقطة المهمة لهذه المكونات ان تضاف بشكل

متوازن اي بتراكيز متساوية لكل منها ، وذلك لان عدم التوازن يؤدي الى أخطاء في تفاعل PCR . تزود الشركات هذه المكونات بشكل محاليل او مستحضرات يحوي كل منها على 2، 10، 25 ملي مول لكل نيوكليوتيد . وفي خليط تفاعل الكوثرة فان هذه المكونات تميل لعمل معقدات مع ايونات المغنسيوم وهذه الخطوة تكون اساسية لان هذه المعقدات هي مواد الاساس الحقيقية لانزيمات الكوثرة .

ومستحضرات dNTPs (السائلة) تكون غير ثابتة من جراء عمليات الصهر والتجميد المتكررة ، ولذلك تقسم الى كميات صغيرة تكفي لتفاعل واحد في كل مرة . كما ان عمليات التبخر والظروف المؤدية الى خلق ظروف حامضية تؤدي الى تحليلها الى dNDPs و dNMPs وهذه النيوكليوتيدات الثنائية والأحادية غير ملائمة لتفاعل الكوثرة الإنزيمي ، لذلك توضع او يضاف اليها داريء بتركيز 10 ملي مول من Tris وبرقم هيدروجيني 7.7- 8.0 .

الايونات ثنائية التكافؤ

واهم هذه الايونات هو Mg^{++} الذي يكون هاما في فعالية العديد من الإنزيمات وأهمها إنزيم كوثرة DNA (DNAP) . ويمكن ان يستعاض عنه عند استعمال إنزيمات كوثرة خاصة بايون المنغنيز Mn^{++} ، ويستعمل الأخير بصورة متعمدة في بعض الحالات عندما يراد تطفير قطع DNA اذ ان التراكيز العالية من ايون المنغنيز تزيد من أخطاء إنزيمات كوثرة DNA .

الإنزيمات

اتضح من مستهل الموضوع ان عملية الكوثرة هي تفاعل إنزيمي بسيط يحاكي ما يحصل داخل الأنظمة الحية . وجوهر التفاعل الإنزيمي هو إنزيم الكوثرة الذي يحتاج في عمله الى قطع يبدأ البناء عليها وإطالتها وهذه تكون في الأنظمة الحية مكونة من RNA وتخلق بفعالية Primase الذي هو إنزيم كوثرة RNA معتمد على أشرطة DNA (Single- stranded DNA dependent RNA Polymerase) ويكون مسئولا عن بدء عملية التضاعف وفي الحقيقة ان إنزيم Primase هو احد إنزيمات كوثرة RNA الخاصة يقتصر عمله على تصنيع البواديء ويزود من قبل الشركات تحت مسميات عدة مثل

T_7 gene 4 Protein
T_7 DNA Priming Protein
T_7 DNA Primase Helicase Protein
T_7 DNA Priming Protein
Dna G gene product

Dna G

Bacteriophage T_7 Gene 4 Protein

وفي الأنظمـة الحيـة تسـاعده بعـض البروتينـات الـتي تـرتبط الى الأشـرطة المفـردة Single- strand binding proteins (SSB) لمنع تكوين التراكيب الثانوية او إعـادة التحـام الأشرطة المفردة . وبعد القيام بعمليـة تخليـق DNA بإنزيمـات الكـوثرة الخاصـة ، تفكـك البواديء . اما في الأنظمة غير الحية فتكون البواديء خارجية مكونـة مـن DNA وتصـمم وتضاف الى خليط التفاعل وعمليـة محاكاتهـا لمـا يحـدث في الأنظمـة الحيـة تعـد مـن العمليات الصعبة – كما سيأتي ذكره– .

ومن جهة ثانية فان عملية الكوثرة تحتاج ان تكـون أشـرطة DNA مفـردة . وفي الأنظمـة الحيوية تقوم بهذه المهمة إنزيمات فل الأشـرطة Helicases وتسـاعدها إنزيمـات المحافظـة على طبوغرافية الجزيئات Topoisomerase (المذكورة سابقا) وتفـك الأشـرطة بـدرجات حرارية معتدلة ، اما خارج الأنظمة الحية اي في تفاعل الكوثرة PCR فان مسخ الأشـرطة المزدوجة وإنتاج أشرطة مفردة لجزيئات DNA فتـتم باسـتعمال الحـرارة اي المسـخ الحـراري Thermal denaturaion والذي ترتب عليـه إجـراء العديـد مـن التحـويرات لغـرض إتمـام التفاعل .

وتعد إنزيمات الكوثرة هي الأساس كما ذكـر آنفـا ، وقـد اسـتعمل في بـدايات اسـتعمال التفاعل وحدة الإنزيم Klenow من إنزيم الكوثرة في البكتريا *Escherichia coli* ، وبالرغم من الخدمات التي قدمها الإنزيم في الوقت السـابق والحاضـر الا ان اسـتعماله يلاقـي بعـض المعوقات ، فكما ذكر ان الأشرطة المزدوجة خارج الأنظمة الحية تمسخ حراريا في بداية كـل دورة تضاعف من عمليات التضخم وهذا يؤدي الى إتلاف إنزيم *E. coli* لـذا وجـب إضـافة وجبة جديدة من الإنزيم بعد كل دورة وعندما تكون هناك 20 –30 دورة فان العملية تكـون مجهدة كما انها تؤثر في حجم خليط التفاعل فضلا عن زيادة احتمالية التلـوث . لـذلك كانت الحاجة ماسة الى استعمال إنزيم او إنزيمات تقاوم المسخ الحراري بدرجة 90 ْم او أكثر .

Taq polymerase

ولتلبية الحاجة الأخيرة استعمل إنزيم الكوثرة Taq الذي استخلص مـن البكتريـا المحبـة للحرارة *Thermus aquaticus* التي تعيش وتنمو في الينابيع الحـارة بدرجـة حـرارة 110 ْم ، واستعماله لا يستدعي فتح وعاء التفاعل بعدد دورات التضاعف . والإنزيم يعمل بدرجـة حرارة مثلى عالية بين 70–72 ْم وهذا يعني ان التفاعل يتم بسـرعة ، ولكـن مـن جهـة ثانية فان للإنزيم فعالية واطئة بدرجات حرارة واطئة مثل حرارة الغرفة (25 - 37 ْم) وهـذا يعني انه يمكـن ان يبـدأ فعالياتـه عنـد إعـداد خلـيط التفاعـل لـذلك تم إجـراء بعـض

التحويرات على التفاعل لمنع هذه الحالة ، وينتج الإنزيم على النطاق التجاري اما من مصادره الأصلية او من *E. coli* بعد تحويرها وإدخال جين إنتاج الإنزيم فيها .

ان استعمال إنزيم Taq الذي يتحمل التسخين المتكرر (90- 94 ْم) ساعد في إمكانية جعل عملية الكوثرة ان تجري بشكل أوتوماتيكي وتتوفر أجهزة خاصة لهذه الأغراض وسمح ايضا باستعمال درجات حرارية عالية لالتحام البواديء مع القوالب وكذلك عملية إطالة الباديء بدرجة حرارية عالية وبذا يقلل من التحام البواديء بالمناطق غير المستهدفة وبالتالي التقليل من النواتج غير المتخصصة وبعبارة أخرى زيادة تخصص التفاعل ، كما مكن من تضخيم مناطق طويلة من DNA القالب او الهدف نتيجة لتقليل التراكيب الثانوية في أشرطة الهدف عند الدرجات الحرارية العالية ، وعند المقارنة فان استيعاب الوحدة Klenow الخاص ببكتريا *E. coli* للتضخيم تصل الى حوالي 400 قاعدة ، في حين ان إنزيم Taq المقاوم للحرارة تصل كفاءته الى حوالي 10 كيلو قاعدة .

ومن ميزات إنزيم Taq المستعمل في تفاعلات الكوثرة بشكل شائع فان العمر النصفي (Half life) له حوالي 40 دقيقة بدرجة حرارة 90 ْم . وللإنزيم بعض المساوئ التي أدت الى البحث عن البدائل ، ومنها ان مضاعفته لجزيئات DNA خارج الأنظمة الحية تكون معدلات الخطأ فيها عالية وذلك لانه يفتقر الى خاصية التصحيح **Proofreading** اي لا يحوي على فعالية القطع **3' to 5' nuclease activity** لإجراء عملية التصحيح ، وهي الخاصية المتوفرة عادة في إنزيمات الكوثرة العائدة الى معظم الخلايا الاخرى . وبذا يكون إدماج قاعدة بالخطأ واردة وتصل الى قاعدة واحدة لكل قطعة بطول كيلو قاعدة ، لذلك تكون النواتج متوائمة (Matched) ولكنها غير متماثلة (Identical) وقد لا تكون هذه مؤثرة بشكل كبير في عملية تحديد التوالي Sequencing للنواتج اذ ان مشاركة قاعدة واحدة خاطئة على شريط واحد او أكثر يمكن التغلب عليه بمشاركة الأشرطة الصحيحة ذات التوالي الصحيح لذلك ينصح عندها بإعادة تحديد التوالي على أكثر من شريط .

كما ان الميزة الأخرى للإنزيم هو إنتاجه لأشرطة فيها جزء غير مزدوج اي بها مثلا A overhang ولو ان هذه تكون مفيدة في بعض الأغراض مثل الكلونة التي تساعد في استعمال ناقل او بلازميد يحوي على T overhang والتي يمكن لحمها بسهولة بواسطة إنزيمات اللحم Ligases و Topoisomerases التي تتم بسرعة نتيجة لتكامل الأشرطة المفردة من A مع الأخرى الحاوية على T (في الناقل) .

وللتوضيح تمتاز اغلب إنزيمات الكوثرة بإنتاج Overhang التي تتكون من امتداد القواعد النتروجينية غير المزدوجة وفي اغلب الأحيان تكون قاعدة الأدنين A وعند الطرف '3 كما موضح في المخطط الآتي :

```
5'-ATCTGACTA-3'
3'-TAGACTGA-5'
```

ويمكن ان تكون على شريطي DNA أي اما 3'-overhang او 5'-overhang وعادة تكون متناظرة التوالي Palindrome . وتشل الحالة ابسط أنواع إنتاج النهايات اللاصقة Stickt او Cohesive والأخيرة تنتج عادة من تأثير الإنزيمات القاطعة ويكون عدد القواعد غير المزدوجة اكبر كما موضح في الآتي :

```
5'-ATCTGACT        + GATGCGTATGCT-3'
3'-TAGACTGACTACG          CATACGA-5'
```

ومثل هذه التراكيب تساعد في العمليات التي تجري بعد عملية الكوثرة مثل الكلونة .
وقد أنتجت إنزيمات منه مثل AmpliTaq Gold الذي يكون نقي جدا . والآخر هندس وراثيا Recombinant AmpliTaq الذي ينتج في *E.coli* ويشبه الطبيعي في افتقاره nuclease (3' to 5' activity) ولكن يملك (5' to 3' activity) .
وفضلا عن ذلك انتج إنزيم Stoffel وهو قطعة محورة او مبتورة من AmpliTaqالذي أزيلت منه قطعة من الحوامض الامينية بطول 289 حامض أميني من الجهة الامينية (N- terminal) ويكون أكثر ثبوتا بالحرارة بحوالي مرتين ويعمل بمدى واسع من تراكيز ايون المغنسيوم (2 –10) ملي مول ويفتقر الى فعالية 5'-3' nuclease activity (الموجودة في الإنزيم المشتق منه) وهذه جعلته ملائما لعمليات الكوثرة العشوائية AP-PCR او RAPD المارة الذكر التي تضخم فيها قطع صغيرة من التواليات بشكل عشوائي . ولقطع الإنزيم هذه القابلية على تضخيم قطع اكبر من الإنزيم الطبيعي .
ومستحضرات إنزيم Taq المزودة من قبل الشركات المختلفة لها مواصفات مختلفة بعض الشيء وذلك نتيجة للتشكيلة Formula الموجود فيها الإنزيم . وكذلك ظروف تقدير الفعالية وتعريف الوحدات وفي العموم فان التراكيز الموصى بها تتراوح بين 1 – 2.5 وحدة / حجم تفاعل بين 50 – 100 مايكرولتر عندما تكون باقي الظروف عند الحدود المثلى .

إنزيم TopoTaq

إنزيم هجين من إنزيم كوثرة DNA (Taq) والدومين الرابط للـ DNA (Topoisomerase) المستخلص من الاركيا *Methanopyrus* التي تعود الى الأحياء المولدة للميثان . ويساعد إنزيم Topoisomerase في فصل أشرطة DNA . الإنزيم يعمل بشكل جيد مع الأهداف الغنية بـ GC ويضخم مناطق تصل الى 20 كيلو قاعدة . ويفضل استعمال الإنزيم الهجين لأنه يقاوم المثبطات العامة لإنزيمات الكوثرة مثل التراكيز العالية من الأملاح والصبغات التي تحشر في أشرطة DNA مثل SYBR و SYBR Gold وبروميد الاثيديوم .

ويقاوم ايضا السوائل الجسمية مثل الإدرار والدم ، وكذلك يقاوم المذيبات العضوية مثل الفينول .
للإنزيم تخصص عالي نتيجة لوجود خاصية او صفة البدء الساخنة نتيجة للمكونات الداخلية في تركيبه . ويلاءم تضخيم البلازميدات و DNA الجينومي مباشرة من مزارع البكتريا ومستعمراتها . وتنقص الإنزيم فعالية التصحيح Exonuclease activity ، ولكن المشتقات الجديدة منه مثل TopoTaq HF (High Fidelity = HF) ، ادمج فيها دومين يمتلك خاصية التصحيح من الاركيا المذكورة أعلاه ، لذلك فان المشتق يمتلك إمكانية عالية من التخصص تفوق عشر أضعاف إنزيم Taq ، وله القابلية على تضخيم قطع مختلفة من أنواع مختلفة من DNA تصل الى 20 كيلو قاعدة .

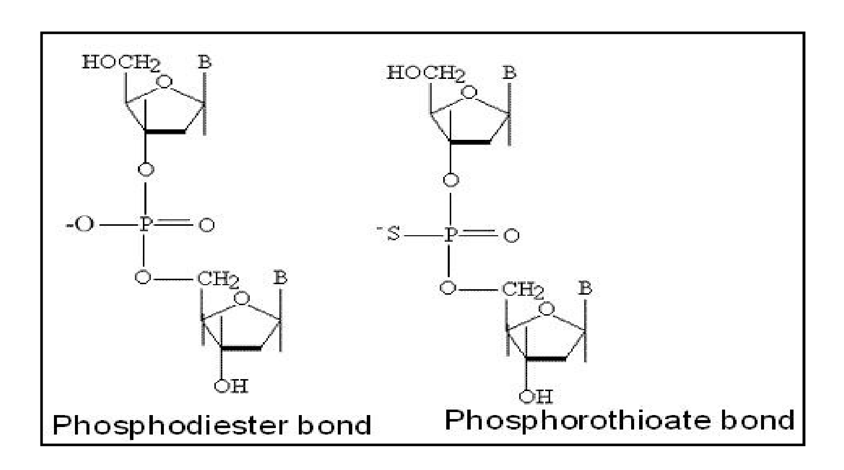
إنزيم Faststart

احد مشتقات Taq الذي يحتاج الى حرارة عالية جدا للتنشيط ، وبذا يساعد في تجنب فعالية إنزيم الكوثرة عند الدرجات الحرارية الواطئة .

إنزيم Pfu

إنزيم كوثرة يستخلص من الاراكيا التي تعيش بدرجات حرارة عالية جدا (Hyperthermophilic archaeon) *Pyrococcus furiosus* استعمل لغرض تلافي عدم الدقة التي تظهر مع إنزيم Taq ، اذ ان الإنزيم يحوي على خاصية التصحيح 3' to 5' nuclease activity والإنزيم ثابت بالحرارة .
ونتيجة لوجود خاصية التصحيح فان الأخطاء الناتجة تكون اقل من حالة استعمال إنزيم Taq لذلك يستعمل في الكلونة الجزيئية ، والمستحضرات التجارية منه تولد خطا واحد لكل 1.3 مليون قاعدة ، ولكن فعاليته بطيئة ويحتاج الى 1 – 2 دقيقة لتضخم قطعة بحجم ألف قاعدة بدرجة 72°م ، وينتج الإنزيم قطع بنهايات مستوية Blunt على عكس إنزيم Taq الذي ينتج نهاية لاصقة او غير مستوية Sticky (overhang) كما ذكر سابقا .
وبعض المستحضرات تدمج إنزيم Pfu مع Taq للحصول على دقة Pfu وسرعة Taq .
ونظرا لفعالية التصحيح للإنزيم المذكورة أعلاه فانه يمكن ان يفكك نهايات البوادىء المستعملة في خليط التفاعل وتزال القواعد النتروجينية من الطرف '3 الى ان يترك حوالي 15 قاعدة من البادىء التي لا تزال قابلة للتكامل مع القالب على الأقل بدرجات الحرارة الواطئة ولكن يمكن ان تكون بتخصص واطئ ويمكن ان تعطي نواتج غير متخصصة وقد تزداد الحال سوءً فيما اذا كان البادىء مصمم بحيث يكون الطرف '3 من البادىء متكامل مع الأهداف وليس الطرف '5 وهي حالة شائعة عند إضافة مواقع تمييز الإنزيمات القاطعة لغرض الكلونة او لأغراض أخرى وفي هذه الحالة فان البادىء المفكك

سوف لا يساعد في إعطاء نواتج PCR ولكن هذه الميزة السيئة يمكن التخلص منها بإضافة آصرة Phosphorothioate bond عند النهاية '3 للبادىء التي تؤدي الى منع فعالية القطع ، وتختلف الآصرة المذكورة عن آصرة Phosphodiester bond كما موضح في الشكل 7 .



Phosphodiester bond Phosphorothioate bond

شكل 7 : أنواع الآصرة الفوسفاتية

لان الآصرة الحاوية على الكبريت لا تصلح ان تكون مادة أساس لفعالية القطع الخارجية Exonucleases العائدة لإنزيم Pfu . وبذلك يمكن الوصول للاستغلال الأمثل لقابلية إنزيم Pfu . وإضافة الآصرة Phosphorothioate bond لا يؤثر في نواتج التفاعل ولا تتدخل مع عمليات الهضم بالإنزيمات الخاصة بالكلونة وغيرها من العمليات .

إنزيم Vent

احد إنزيمات الكوثرة يستخلص من *Thermococcus litoralis* يعمل بدرجات حرارية عالية يشبه إنزيم Pfu في خاصية التصحيح 3' to 5' nuclease activity . وينتج الإنزيم نهايات ملساء لنواتج تفاعل الكوثرة والتي يمكن ان تدمج مع ناقل مقطوع Blunt – cut vector في حالة استعمال النواتج في عمليات الكلونة . وله خاصية النسخ العكسي بوجود ايونات Mn^{++} ولذلك يسمح بتضخيم قطع من RNA .

إنزيمات كوثرة أخرى

- هناك إنزيمات أخرى مثل Pow المستخلص من الاراكيا *Pyrococcus woesei* وهو من الإنزيمات الحاوية على قابلية التصحيح(3' to 5' nuclease activity) .

وفضلا عن ذلك تم التلاعب بالإنزيمات الموجودة لإنتاج إنزيمات مهندسة وراثيا ومنها :

- rTth إنزيم مهندس من إنزيم الكوثرة في *Thermus thermophilus* ويمتاز الإنزيم بثبوته وقابليته على كوثرة RNA (RNA PCR) لإعطاء cDNA اي عملية النسخ العكسي Reverse transcription بوجود ايونات المنغنيز (Mn^{++}) ، وعند حدوث هذه العملية بدرجات حرارية عالية يسمح بإنتاج cDNA بكفاءة عالية من جزيئات RNA ذات التراكيب المعقدة . اما التضخيم الطبيعي ومضاعفة DNA يمكن ان تحدث بعد خلب ايونات المنغنيز وإضافة ايونات المغنسيوم ($MgCl_2$) في محاليل دارئة خاصة يمكن ان تزود مع العدد التجارية .
- rTth DNAP XL إنزيم يشبه الإنزيم أعلاه ولكنه نقي جدا وثابت بالحرارة ومصمم لتضخيم الأهداف من DNA و RNA الأطول من `5 كيلو قاعدة ، (XL = eXtra Long) والإنزيم محضر ليحوي فعالية مثالية للتصحيح 3` to `5` nuclease activity`)) ويزود عادة مع معدات طريقة البدء الساخنة وكذلك داريء خاص به (XL buffer) الذي يحوي على الكليسرول و DMSO ، وتعد هذه العدد الأهم في تضخيم القطع الطويلة ، ولكن يجب الأخذ بنظر الاعتبار ان تفاعلات الكوثرة العامة تضخم قطع تمتد من عدة مئات الى القليل من الآلاف من القواعد ، وعندما تكون القطع طويلة فيحصل عدم توازن بين الدقة وسرعة الإنزيم ، ولذلك كلما طالت القطعة زادت احتمالية الخطأ .
- T4 DNA polymerase يستعمل الإنزيم لأنه أكثر دقة من قطعة Klenow الا انه يتلف بالحرارة ايضا .

والجدول التالي (جدول1) يوضح بعض الإنزيمات المتوفرة تجاريا وبعض مواصفاتها .

جدول **1** : الإنزيمات المتوفرة تجاريا مع بعض مواصفاتها

الانزيم	المصدر	5'--3' Exonuclease Activity	3'--5' Exonuclease Activity	95°C Half-life (min)	الاسم التجاري	الشركة	Extension Rate (nucleosides/s)	معدل الخطأ	Time (s) to 1kb (72°C)
Taq	*Thermus aquaticus*	+	-	40	AmpliTaq, AmpliTaq Gold	Promega, Roche, Invitrogen and many others.	75	1 in 10^3	32
Pfu	*Pyrococcus furiosus*	-	+	120	PfuTurbo	Stratagene, Fermentas, Invitrogen among others	60	1 in 1.3 x 10^6	60-120
Pwo	*Pyrococcus* woesei	-	+						
Tfl	*Thermas flavus*	-	-						
rTth	*Themus thermophilus*	+	-	20					
Tli	*Thermus litoris*	-	+	400	Vent				
Tma	*Thermotoga maritima*	-	+	>50					

الفصل الثالث	
البوادىء **Primers** وظروف التفاعل	
المواصفات العامة للبوادىء	
أنواع البوادىء	
تحوير البوادىء	
المضافات **Additives**	
تفاعل الكوثرة	
أطوار التفاعل	
عدد الدورات	
النسق الحراري لتفاعل الكوثرة	
الظروف المؤثرة في تفاعل الكوثرة	
تداخل العوامل المؤثرة في تفاعل الكوثرة	
الأدوات والأجهزة	

البـواديء Primers وظـروف التـفاعـل

قـطع مـن تواليـات DNA مكـملـة للتواليات التـي تحيط بالـهدف المراد تضـخيمه ، تسـتخدم ليبنـي عليـها إنزيم الكـوثرة شـريط مـفرد يقابل شـريط القـالب عـلى غـرار بـواديءRNA الـتي يبنيـها إنزيم Primase في الأنـظمـة الحيوية ، تسـتخـدم في كـوثرة DNA خـارج الأنـظمـة الحية (PCR) .

وأنواع التواليات والجينات المودعة في قواعد البيانات هـي في ازدياد مـهول ، بعـد ان تم تحديـد تواليات العـديد مـن الجينات ذات الـدرجات المختلفـة مـن الأهـميـة في العـديـد مـن أنـواع الكـائنات الحية ، البعـض منـها يسـتعـمل كـموديلات دراسـية لـذلك تكـون الحاجـة ماسـة لإعادة تحديد بعـض هـذه التواليات المودعة لغرض اسـتعمالـها لأغـراض دراسـية مختلفـة مثل معرفة مسـتوى التعـبير الجيـني او غيرها مـن المهام . ولـهـذه الأسـباب وغيرهـا كـانـت هناك حاجة ماسة لبواديء عامة وهـذه تسـهل دراسـة الجينـات الجديـدة فضـلا عـن ان عملية كـوثرة اي توالي تعتمـد بشـكـل كـبير عـلى كـفاءة البـواديء المسـتعـملة لـذلك كـانـت الحاجة ماسـة الى إيجاد إسـتراتيجيات عامـة تسـتعـمل في تصـميم البـواديء حـتى تلـك اللازمة لتضـخيم تواليات غير معروفة . وصلاحية توالي محدد ليكـون بادئـا تعتمـد عـلى عدة ظروف منـها :

- حـركيات الارتباط وفكـه مع الشـريط القـالب عـند درجات حـرارة الالتحـام والإطالـة او إضـافة القـواعـد الجديدة .
- ثبوت المزدوجات عـند عـدم وجـود تلاؤم Mismatches للنيوكـليوتيدات وكـذلك مـواقـعها .
- كـفاءة إنزيم الكـوثرة عـلى تمييز مناطق عـدم التلاؤم وإطالـة الشـريط في تلك المواقـع اي تكـوين Mismatched duplexes .

المواصـفات العـامـة للبواديء

ضـمن الإسـتراتيجيات العـامة وضـعـت بعـض المواصـفات لغرض تصـميم بواديء كـفـوءة ومـن هـذه المواصـفات والإرشـادات :

- تصـميم البواديء للمناطق الثـابتة مـن التـوالي وهـذه تكـون أكـثر أهـمية للأحياء بدائية النواة التـي توجـد في النـوع الواحـد العـديد مـن السـلالات الـتي تختلـف في التواليـات

بالنسبة للجين الواحد لذلك فعند عدم معرفة التوالي للسلالات المختلفة يفضل ان يكون البادىء عامً ليغطي مجموعة السلالات المختلفة .

- طول البادىء . تختلف هذه الصفة التي يوصى بها ولكنها في العموم تكون بحدود 17 – 40 قاعدة الذي يعتمد على المحتوى من AT . ويعد طول البادىء أهم المواصفات ومن العوامل المهمة جدا . واغلب أطوال البوادىء تدور حول الرقم 16 اعتمادا على الاحتمالات فمثلا هناك

- احتمالية 1\4 من الاحتمالات ان تكون القاعدة اما T,G,C,A
- في حين تكون الاحتمالية 1\ 4^2 هي 1 من 16 ان يكون عندنا زوج من النيوكليوتيدات مثل AG , AC وهكذا
- تقل الاحتمالية الى 1 من 256 (1\ 4^4) في ان يكون التوالي TGCA . ولذا يتوقع ان يكون احتمال وجود هناك 16 قاعدة بتوالي محدد بحدود 1 من 4 ملايين . ولذلك فوجود 17 قاعدة للبادىء مكملة لتوالي الهدف تكون متخصصة جدا (من النواحي الإحصائية) . وهذه تكون أكثر من احتمالية ارتباط الأجسام المضادة وحيدة النسيلة Monoclonal antibodies مع المستضد الخاص بها . وعليه يستعمل عدد النيوكليوتيدات 17-mer بشكل روتيني لتصميم بوادىء للـ DNA الجينومي (gDNA) للجينات الحيوانية والنباتية . والغاية من وراء ذلك ان يكون طول البادىء قادرا على تكوين معقد او مزدوج ثابت مع منطقة خاصة من DNA المستهدف وتكون احتمالية ارتباطه بمواقع أخرى قليلة جدا .

وكقاعدة عامة يفضل تصميم البادىء بأقل طول يضمن حرارة انصهار Tm (بين مزدوج البادىء وتوالي الهدف) بين 56 –62ْم اذ ان هذا يضمن تخصصية عالية وكفاءة جيدة . وعند تقصير البادىء عن الطول الموصى به تزداد احتمالية ارتباطه بمواقع غير متخصصة . وهناك قاعدة عامة هي ان زيادة طول البادىء بقاعدة نتروجينية واحدة يؤدي الى زيادة التخصص أربعة أضعاف . وعليه يمثل طول البادىء احد الأسس المهمة في تخصص البادىء . وإضافة الى ما ذكر أعلاه فان طول البادىء يعد دالة للانفرادية Uniqueness للبادىء وعليه فان زيادة الطول يزيد من التخصص . فضلا عن انه يزيد من ثبوت الهجين المتكون . ولكن زيادة احتمالية تحمل عدم التلاؤم Nucleotide mismatch tolerance تؤثر بشكل غير مباشر في التخصص أي ان زيادة الطول ليست دائما تصب في صالح التخصص المطلق .

وطول البادىء يعتمد بشكل كبير على جوانب الدرجات الحرارية كما سيأتي ذكره لاحقا. والملاحظ ان البوادىء الطويلة تكون لازمة في حالات خاصة فمثلا استعمال بادىء بطول 28 –35 قاعدة لازمة للتمييز بين الجينات المتماثلة في الأنواع المختلفة ويمكن ان تستعمل البوادىء الطويلة عند توفر معلومات إضافية عند التوالي الهدف مثل :

- مواقع ارتباط القطيفات Motifs .
- مواقع عمل الإنزيمات القاطعة وغيرها من البيانات .

وبذا يكون من البديهي معرفة ان طول البادىء يرتبط ارتباطا وثيقا مع صفة تخصصية البادىء .

محتويات البادىء من القواعد النتروجينية وتأثيرها في المواصفات .

لإنجاح عملية الكوثرة لابد من اختيار بادىء فريد من توالياته المقابلة لتواليات DNA المراد تضخمه . ويفضل في البوادىء زيادة محتواها من G و C الى حد ما مثلا تكون بين 50 – 60 ٪ . كما ان التوالي يجب ان يكون خاليا من Inosine خاصة عند استعمال نواتج الكوثرة في تحديد التوالي اي ان Sequencing primers يجب ان تخلو منه لانها سوف لا تعمل او تعطي نتائج مضللة .

درجات الحرارة :

يجب ان تكون درجات الحرارة مثل حرارة الانصهار بين 55–80 ْم كحدود عامة ، وبعد تحديد حرارة الانصهار **(Tm) melting temperature** ، تحدد حرارة الالتحام **(Ta) Annealing temp** التي تكون عادة اقل بـ 5 درجات من Tm .

أطراف البوادىء : لأطراف البوادىء '5 و '3 أهمية كبيرة في تحديد العديد من المواصفات وتساهم بشكل كبير في نجاح عملية الكوثرة .

- **الطرف '5** : يمثل نهاية المطاف بالنسبة للإضافة وعمل إنزيم الكوثرة اذ يبدأ الإنزيم بالإضافة على النهاية '3 للبادىء . ويحتاج البادىء ان يكون الطرف '5 فيه ثابتا ، وعند إضافة قواعد إضافية مثل قواعد تمثل مواقع تميز للإنزيمات القاطعة التي لا تكون لها علاقة بتوالي البادىء ، عندها يجب إجراء بعض التحويرات على ظروف التفاعل مثلا ان الدورات 4 –5 الأولى تتم تحت درجات التحام العادية ثم تتم باقي الدورات عند درجة التحام أخرى يتم احتسابها على افتراض ان القواعد الإضافية هي ضمن القالب . ولذلك يلاحظ ان البوادىء الجيدة تحوي في طرفها '5 على G او C ضمن الثلاث قواعد الأخيرة

لزيادة كفاءة الارتباط بالموقع المستهدف اذ ان هذه كماشة تقلل من ظهور الحزم غير المتخصصة .

○ **الطرف '3** : يكون الطرف مهما للتفاعل وتلاؤم هذه النهاية مع القالب ضرورية لنجاح تفاعل الكوثرة . وعند وجود حالة عدم تلاؤم فيفضل ان تكون ضمن 5 – 6 قواعد الأخيرة من النهاية '3 وبعض الأحيان يمكن معالجة عدم التلاؤم هذا بالتلاعب بحرارة الالتحام ولكن بعض الأحيان يفشل التفاعل ، لذلك يتم التأكد من هذه الحالة باستعمال برامج الحاسوب ضمن إجراء التحليلات على البادئ قبل الاستعمال (كما سيأتي ذكره لاحقا) . وعلى العموم فان هذا الطرف يجب ان ينتهي بالقواعد G او C او GC او CG اذ ان هذا يزيد ن ثبوت الارتباط ويمنع التململ Breathing للنهايات وتزداد كفاءتها في الارتباط (Priming) للقوالب ، وهذا يكون مساعدا في الارتباط المتخصص عند النهاية `3 نظرا لقوة ارتباط كل من G و C ، ولكن مثل هذه يجب ان لا تكون أكثر من ثلاث قواعد متشابهة متجاورة . ويقاس ثبوت الطرف بحساب قيم الطاقة الحرة (ΔG) للقواعد الخمس الأخيرة .

من هذا يتضح ان الطرف '3 هو المسئول عن عملية خطأ ارتباط البادئ Mispriming . ولكن في بعض الأحيان يكون عدم التلاؤم مفيدا كما في حالة التطفير Amplification refractory mutation system (ARMS) اذ يكون الارتباط الخاطئ مطلوبا . والنظام الأخير يستعمل للكشف عن الطفرات في الخلايا التناسلية او الخلايا الجسمية باستعمال تفاعلات الكوثرة ، اذ تحضر بوادئ تلاؤم الطرف '3 في القطعة المطفرة ، ثم تجري عملية الكوثرة والترحيل الهلامي وتكون النتيجة النهائية هو وجود الطفرة (+) او عدم وجودها (–) . وهذا النظام لا يعطي نسبة الطفرات الى النوع الطبيعي في خليط من جزيئات DNA ، ولذلك يتم اللجوء الى طرق كوثرة أخرى مثل RT-PCR لتحديد نسب وكمية الطفرات .

تواليات البادئ الداخلية :

البوادئ المصممة يمكن ان تعاني من بعض المشاكل ان لم يتم الانتباه الى مكونات البادئ الداخلية اي غير الأطراف '3 و'5 . فتوالي البادئ الذي فيه مكررات كثيرة High repetitive sequences سيؤدي الى ظهور المسحات عندما يستعمل لتضخيم DNA الجينومي ولكن مثل هذا البادئ يمكن ان يعطي حزم واضحة عند استعماله لتضخيم هدف محدد ، ومع هذا وكقاعدة عامة يجب تجنب وجود المكررات ويقصد هنا بالمكررات وجود تكرار لنيوكليوتيدات ثنائية مثل TGTGTGTG ووجود أربع من النيوكليوتيدات الثنائية يكون مقبولا .

كما يجب تجنب وجود قطعة طويلة من التعاقبات Runs مثل وجود ثلاث او أكثر من G (GGGG) او C لان المناطق الغنية بـ G_s او C_s تؤدي الى عدم ارتباط البادىء بشكل صحيح خاصة عند النهاية '3 وتساعد في ظهور مزدوجات البادىء Primer dimer الذي يؤدي الى قلة الحاصل Yield للتفاعل وفي العادة يسمح بوجود تكرار لأربع قواعد وليس أكثر .

مزدوجات البواديء :

ان عدم الانتباه لتواليات البادىء يمكن ان تؤدي الى تكوين مزدوجات البواديء ، وتؤثر هذه في نواتج التفاعل اذ تستهلك مكونات الخليط في كوثرة وبناء هذه المزدوجات .
وهناك نوعان من المزدوجات وهي المزدوجات الذاتية Self-dimers (Homodimers) التي تنتج من تداخلات تواليات البادىء مع بعضها Intramolecular interactions مثلا البادىء الأمامي (Sense) . وتحمل هذه المزدوجات وإمكانية التغاضي عنها يعتمد على الطاقة الحرة اللازمة لإلغائها ، فالمزدوجات عند الطرف '3 يمكن تحملها عندما تكون ΔG بحدود 5 Kcal/mol- والداخلية منها عندما تكون ΔG بحدود 6 Kcal/mol- .
اما النوع الثاني من المزدوجات فهو المزدوجات المتباينة او المتداخلة Cross-dimer (Heterodimer) والتي تنتج من تداخلات غير ذاتية Intermolecular interactions بين البادىء الأمامي والعكسي (Sense and Antisense) ومثل هذه لها قيم طاقات حرة يمكن تحملها وتكون ΔG لها 5 Kcal/mol- بالنسبة للطرفية منها و 6 Kcal/mol- للداخلية .

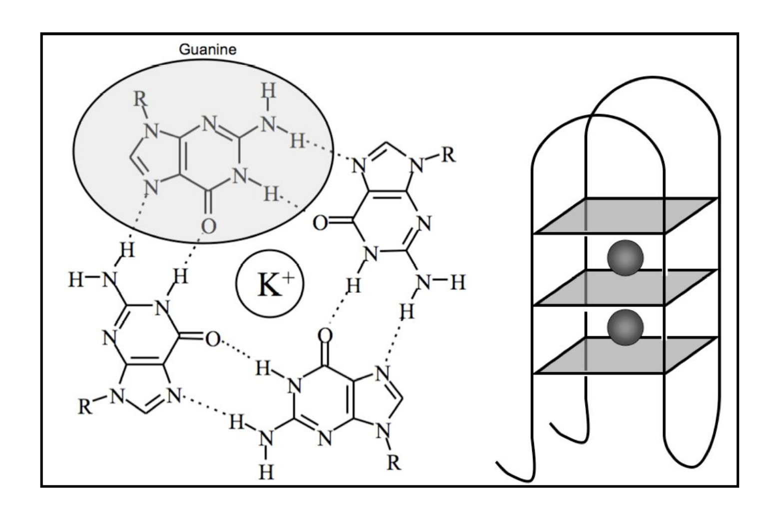
التراكيب الثانوية :

ومن جهة ثانية فان البواديء تعمل بشكل جيد اذا كان هناك القليل من التراكيب الثانوية (للبادىء) لان مثل هذه التراكيب تعيق عمليات الالتحام وإطالة البادىء (اي بناء الشريط المكمل للهدف) . ومن هذه التراكيب الثانوية التي تعيق عمل البواديء هو تكوين ماشات الشعر Hairpins التي تكون نتيجة تداخل التواليات الذاتي ، ويقاس ثبوتها بقيم ΔG التي تقيس تلقائية التفاعل ، وهناك قيم مسموح بها ، فبالنسبة للماشات الطرفية عند النهاية '3 تكون القيم بحدود 2 Kcal/mol- اما الداخلية فتكون - 3 Kcal/mol وقيم ΔG هذه تمثل الطاقة اللازمة لكسر ماشات الشعر التي تمثل احد التراكيب الثانوية ، فالقيم السالبة العالية تشير الى ثبوت هذه التراكيب غير المرغوب فيه . ووجود ماشات الشعر عند الطرف '3 يؤثر بشكل سلبي في التفاعل ويمكن حساب الطاقة الحرة وفق المعادلة

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

وبالنتيجة فان البواديء بعد تصميمها تخضع لبرامج تقييم منها تحديد ثبوت البادئ الذي يقاس بتحديد False priming efficiency وغيرها من المواصفات . وعلى العموم وكصفة عامة يفضل ان يكون الباديء ذات نهاية '5 ثابتة وطرف '3 اقل ثبوتا .

ومن جهة فان البواديء يجب ان تصمم لمناطق في أشرطة DNA التي لا تكون تراكيب ثانوية التي يكون لها درجات انصهار أعلى من الباديء مثل وجود ما يسمى رباعيات الكوانين G4-DNA التي يطلق عليها تسميات أخرى مثل G-quadruplexes او G-tetrads وتظهر في المناطق الغنية بالكوانين حيث تتكون تراكيب رباعية وذلك بتكوين أواصر هيدروجينية خاصة (Hoogsteen H- bonding) وتترتب مع بعضها ويثبت تركيبها بوجود ايونات البوتاسيوم وهي موضحة في الشكل الآتي (شكل 8) :



شكل 8 : تركيب رباعيات الكوانين

أنواع البواديء :

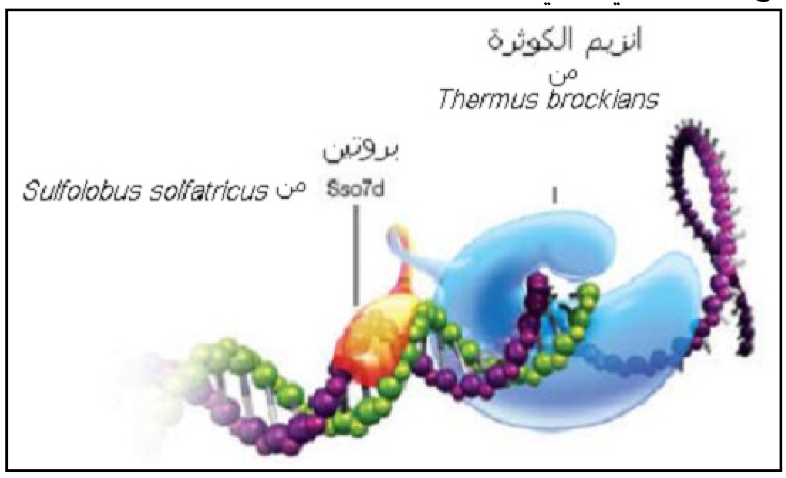
كما ذكر في تعريف البواديء انها قطع مكملة لتوالي DNA المراد تضخيمه ترتبط الى أشرطة DNA الممسوخة للتزويد بمواقع بدء لإطالة جزيئة DNA وهذه البواديء يمكن ان تكون على أنواع عدة منها :

البوادئ العامة Universal primers :

وهي بوادئ يمكن ان تستعمل في مدى واسع من الأحياء لانها تكمل مواقع من DNA عامة في الأحياء ، اي يكون لها قوالب واسعة الانتشار ، فمثلا جينات الرايبوزومات Ribosomal DNA genes تحوي على توالي عام يكاد يكون موجود في كل البكتريا لذلك تستعمل بشكل كبير مع أجناس وأنواع بكتريا كثيرة ، وكذلك الحال مع Alu primers اذ ان توالي Alu الذي توجد منه حوالي أكثر من 000،100 نسخة في الجينوم البشري وكذلك الخلايا الحيوانية الأخرى لذلك تستعمل في بعض الأحيان بوادئ عامة في خطوط الخلايا الحيوانية المختلفة وفي العموم عند استعمال البوادئ العامة يكون من المفضل تخفيض حرارة الالتحام الى 40 – 55° م .

البوادئ القصيرة Miniprimers

بوادئ قصيرة يتراوح طولها من 9–10 قاعدة تسمى ايضا Smalligos وهي تستعمل للكشف عن التواليات التي لا تكشف بالطرف العادية (اي باستعمال بوادئ أطول وإنزيم Taq) ويفضل في حالة استعمال مثل هذه البوادئ استعمال إنزيمات ثابتة للحرارة بشكل كبير مثل S-Tbr (وهو إنزيم مهندس من إنزيم كوثرة DNAP العائدة لبكتريا *Thermus brockianus* اذ أزيل من الإنزيم N- terminal 5' – 3' exonuclease وحل محله بروتين خاص للارتباط بأشرطة DNA المزدوجة مثل Sso7d الذي له وزن الجزيئي 7 كيلو دالتون المشتق من الاركيا *Sulfolobus solfataricus*) الذي يكون قادرا على إطالة القطع الصغيرة الموضح شكله في الآتي .



شكل 8 \ أ : Sso7d البروتين المساعد لتحوير فعالية إنزيم الكوثرة

والإنزيمات بعد التحوير وإضافة البروتين Sso7d يؤدي ذلك الى زيادة فعالية الإنزيمات من 10–5 مرات كما موضح في الآتي :

الانزيم	الزيادة في قابليته بعد اضافة Sso7d
Taq	15-19nt
Sso7d-Taq	**96-109nt**
Pfu	2-3nt
Pfu-Sso7d	**35-39nt**
ΔTaq	2-4nt
Sso7d- ΔTaq	**26-39nt**

لهذه البوادىء استعمالات كثيرة مثل التضخيم العشوائي RAPD (المار الذكر) وكذلك في تضخيم gDNA لبعض البكتريا . وبما ان هذه البوادىء تسمح لتفاعل PCR باستهداف مناطق صغيرة لذلك تكون مفيدة في تضخيم المناطق غير المعروفة ولكن ثابتة كما في 16S rRNA و 18S rRNA(في حقيقية النواة) من جينات rRNA ، وتستعمل في الكشف عن تنوع الميكروبات ، وتستعمل في الطب الجنائي عند استعمال DNA المايتوكوندريا mtDNA الذي يوجد بكثرة في الخلايا ويكون أكثر ثبوتا خاصة في النماذج المتحللة ، ونظرا للتغاير الكبير في نماذج mtDNA والطفرات التي تحصل فيه لذلك كان من الأفضل استعمال البوادىء الصغيرة او بعض الأحيان المتوسطة Midi التي يمكن ان تصمم بالبرامج العامة لتصميم البوادي كما في برنامج Primer3 .

بوادىء تفاعل الكوثرة المتعددة Multiplex primers

عند استعمال تفاعل كوثرة واحد لتضخيم أكثر من هدف يراعى في البوادىء المستعملة ان تكون البوادىء ذات حرارة التحام متشابهة وكذلك GC٪ متشابه ، مع الأخذ بنظر الاعتبار ان البوادىء المستعملة تعطي نواتج مختلفة في الطول او الحجم ليسهل فصلها ودراستها بعد الترحيل الكهربائي . ويكون من الضروري فحص التكامل بين كل البوادىء المستعملة في التفاعل ، وتوجد برامج خاصة لتصميمها كما ان ظروف التفاعل يمكن ان تحور لتلاؤم التفاعل مثل البدء بالطريقة الساخنة او غيرها من تحوير التفاعل لزيادة الكفاءة .

البوادىء الهجينة Chimeric primers

بوادىء يتم استبدال بعض قواعد DNA فيها بقواعد من RNA لتكوين توالي ذا أصول مختلفة Chimeric sequence ، وبصورة عامة تكون حرارة التحام هذه البوادىء أوطأ من التحام بوادىء DNA . تستعمل هذه البوادىء لأغراض خاصة وكذلك تستعمل في تحديد الكميات qPCR .

البوادىء المشتتة Degenerate primers

بوادىء تصمم بالاعتماد على تواليات الحوامض الامينية بدلا من تواليات DNA التي شفرت للبروتينات المعروفة ذات العلاقة ولكن بوجود بعض الاختلافات في مواقع محددة . وتحضر على أمل ان احدها يكون مكملا بشكل تام لتوالي DNA المستهدف . وفي هذه الحالة يتم عكس الترجمة لتحديد كل النيوكليوتيدات المحتملة وبالتالي الشفرات الممكنة في توالي DNA الذي شفر لهذا البروتين .

ونظرا لكون معظم الحوامض الامينية يشفر لها بأكثر من شفرة وللحد من عدد البوادىء التي تنتجها البرامج المعدة لهذا الغرض التي تربط او تحوي على برامج خاصة بالترجمة الرجعية للحوامض الامينية يتم اختيار المناطق التي تحوي حوامض أمينية يشفر لها بشفرة واحدة او أكثر أي التي تعاني اقل ما يمكن من تشتت الشفرات .

هذه البوادىء لها استعمالات مهمة مثل البحث عن عوائل الجينات وإيجاد الجينات الجديدة التي يكون جزء من تواليات بروتيناتها معروفا ، وإيجاد الجينات المتناظرة في الأنواع المختلفة ، وكذلك دراسة الفيروسات ذات العلاقة مع بعضها ، ويمكن ان تستعمل في عمليات التضخيم وتحديد التواليات في تفاعل واحد .

والاستعمال الآخر لهذا المصطلح هو للبوادىء التي يكون فيها أكثر من خيار وتستعمل لتضخيم عدد من التواليات ذات العلاقة ، فمثلا التوالي الآتي :

TCGAATTCNCCYAAYTGNCCNT

Y=T+C
N=A+C+G+T

والتشتت يقلل من تخصص البادىء وتكون هناك فرصة اكبر لعدم التلاؤم . وبعض الأحيان يستعمل dI (deoxyinosine) عن عمد لانه يستطيع الارتباط الى أي من القواعد الأربعة ، وهذه تساعد في استمرار عملية الكوثرة حتى بعد نفاد النيوكليوتيدات من الخليط ، وهذه تكون غير ملائمة عندما يكون الناتج حاويا على أربعة من dIs ، كما ان الاينوزين لا يفضل استعماله عند تضخيم قطعة من DNA يرام تحديد تواليها فيما بعد لانه يؤثر في النتائج بشكل كبير .

بوادىء النواقل Vector primers

وهذه تستعمل عند نقل وتكثير قطع من cDNA ، اذ يدخل هذه القطع في الناقل ، ثم تصمم البوادىء للمنطقة التي تحيط موقع الالتحام في الناقل وبذلك يتم تضخيم القطعة المنقولة المقحمة .

بوادىء cDNA primers

البوادىء في هذه الحالة تستعمل لتضخيم قطع محدودة وتكون بطول حوالي 21 قاعدة ، عشرون منها هي T والأخيرة هي اما T,G,C,A عند النهاية '3 ، لتكون القواعد العشرون مقابلة للـ Poly A tail في mRNA ومنها الموضح في الآتي :

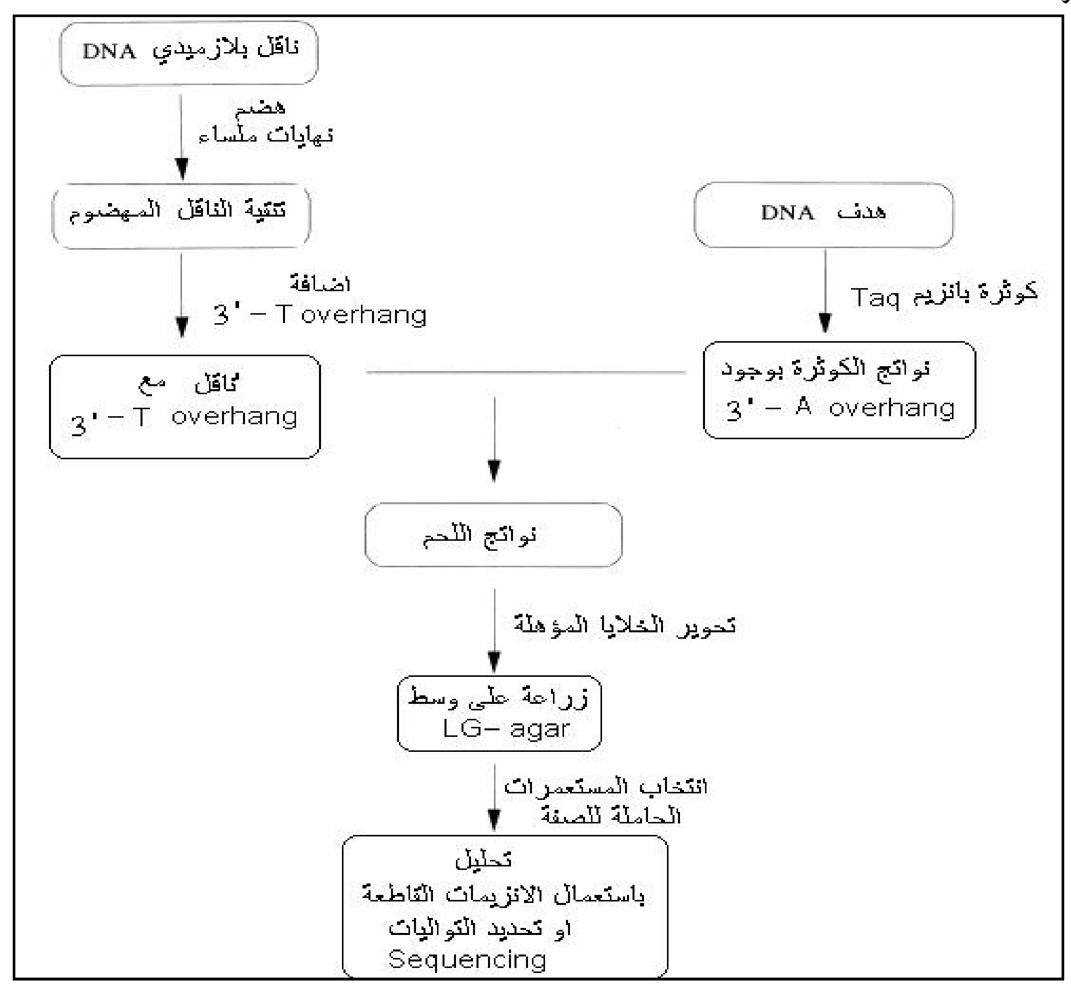
5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT(A,G,C)-3'

تحوير البوادىء

بعد تصميم البوادىء يمكن ان يجرى عليها بعض التحويرات التي تكون مهمة لانجاز التفاعل الذي ستعمل فيه ويتم اختيار البوادىء التي لا تكون مزدوجات البوادىء ويمكن ان تعمل نقطة بدء للإطالة .

- **بوادىء الكلونة** : في هذه البوادىء يمكن إضافة 5 – 6 قواعد التي تميزها إنزيمات القطع عندما يرام استعمال النواتج للكلونة وتضاف الى بادىء الكلونة قواعد إضافية عند النهايات ، ويفضل إضافة توالي أطول من موقع تميز الإنزيم القاطع بزيادة 2– 3 قواعد حيث ان معظم الإنزيمات تعمل بكفاءة عند وجود مثل هذه الزيادة ، وهذه لا

تتكامل مع الشريط القالب بدون ان تؤثر في عملية التضخيم . وفي مثل هـذه البـواديء ترفق الشركات المنتجة مواقع الفلق للإنزيمات والمعلومات حول هذه التحويرات .
وقد تكون التحويرات لغـرض آخـر مثـل اسـتعمال Phosphorothioate primers الـتي تستعمل مـع إنزيمـات Pfu و Vent الـتي تتصـف بفعاليـة التصـحيح ، لـذلك تضـاف Phosphorothioate bond لإيقاف فعالية Exonucleases التي يمكن ان تقصر البـواديء (كما مر ذكره في موقع آخر) .
ويفضل ان يكون كل من البادىء الأمامي والعكسـي بـدرجات انصـهار متقاربـة لزيـادة الحاصل من العملية لان الاختلاف بدرجة الحرارة هذه بمقدار 5ْم او أكثر قد يؤدي الى فشل عملية التضخيم ، ويتم التضخيم بوجود وفرة من تركيز البوادىء بمستويات عالية تتراوح بين 0.1 – 1مايكرومول وكذلك الحال مع وحدات البناء dNTPs الـتي هـي الأخـرى يجـب ان تكون بتراكيز عالية وذات نقاوة عالية . ويوضح الشكل التالي خطوات الكوثرة (شكل 9) الخطوات المستعملة .



شكل 9 : خطوات تفاعل الكوثرة في حالة الكلونة

- **البواديء المعلمة** : البواديء التي تعلم سواءا واحدا منها او الاثنين بمواد مشعة او صبغات متفلورة ، وهذه تستعمل عادة في الكوثرة غير المتناظرة المارة الذكر لإنتاج المجسات .

المضافات Additives

يستعمل عدد من المضافات في تفاعلات الكوثرة لزيادة الناتج او زيادة التخصص او جعل التفاعلات منسجمة على طول العملية خاصة لجزيئات DNA الغنية بقواعد C.G والأخرى الحاوية على تراكيب ثانوية ثابتة . كما ان بعض التفاعلات لا تحدث الا بوجود مثل هذه العوامل المشجعة . وتستعمل بتراكيز مختلفة كما موضح بعضها في الجدول الآتي (جدول2)

جدول **2** : المضافات المستعملة في تفاعلات الكوثرة .

المادة	التراكيز الموصى بها
الكليسرول	٪ 5–2 ٪
Polyethylene glycol متعدد الاثيلين PEG 6000	٪ 15–5 ٪
(Dimethyl sulfoxide) DMSO	٪ 10–2
(PEG) DMF	بحدود 10٪
منظفات لا أيونية Non- ionic detergents (Triton X – 100)	٪ 1– 0.1 ٪
Tween 20	٪0.5
Tween 40	٪0.5
Formamide	٪5 –1٪
Betaine	1.7 – 1.0 مولر

15–100 ملي مول	TMAC (Tetramethylammonium chloride)
	BSA (Bovine serum albumin)
التركيز يعتمد على نسبة GTP الطبيعي	dC7GTP (7-deaza-2'-deoxyguanosine)
10 – 100 مايكرومول	TMAO (Trimethyl amine oxide)

فضلا عن مضافات أخرى .

والملاحظ ان بعض الإنزيمات تعمل بشكل جيد عند وجود المنظفات وذلك – ربما- بمنعها لتكتل وتجمع بروتينات الإنزيمات ، ولكن بعض هذه المضافات وخاصة عند التراكيز العالية قد لا تؤدي الى فائدة في التفاعل لذلك كان لابد من تجربتها مع كل تشكيلة من البواديء ، فمثلا :

- DMSO : يحافظ على فعالية إنزيم Taq (الأكثر استعمالا في تفاعلات الكوثرة) عندما يكون بتراكيز واطئة وعندما يزداد تركيزه الى 10٪ فانه يؤدي الى خفض فعالية الإنزيم الى حوالي 50٪ وعند تركيز 20٪ تنخفض الفعالية الى حوالي 10٪ ، ولذلك لا يستعمل بشكل روتيني وانما فقط عند الضرورة ولكنه في الأحوال العادية يقلل من التراكيب الثانوية خاصة في القوالب الغنية بـ GC ويساعد في تضخيم أهداف تصل الى أكثر من كيلو قاعدة .
- اما المضاف Betaine : فيوصى باستعماله بشكل Betaine (mono) hydrate ولا يستعمل بشكل ملح الكلوريد Betaine HCl .

وكما موضح في الجدول أعلاه فأن استعمال المنظفات اللايونية مثل TritonX-100 او Tween 20 فهذه تثبت فعالية إنزيم الكوثرة Taq وتمنع تكوين التراكيب الثانوية عند التراكيز المذكورة مما يؤدي الى زيادة نواتج التفاعل .

- مضاف Formamide يستعمل بتراكيز 1–5 ٪ ويمكن ان تصل الى 10٪ ، وأثبتت التجارب ان التراكيز الواطئة لا تؤثر في فعالية إنزيم Taq ولكن عند تركيز أعلى من 10٪ فانه يثبط عملية التضخيم لذلك يستعمل عند الضرورة لجعل عملية التضخيم عند الدرجة المثلى .
- مضاف TAMC يستعمل بالتراكيز المذكورة للتخلص من ارتباط البادىء غير المتخصص

- مضاهي الكوانين 7-deaza-2-GTP يمكن ان يستعمل في تفاعلات تضخيم قوالب DNA الحاوية على تراكيب ثانوية ثابتة اذ يستعمل بدلا من dGTP بنسبة 1 : 3 اي يستعمل المضاهي بنسبة ثلاثة أضعاف النيوكلوتيد الطبيعي (dGTP) .
- يستعمل بروتين مصل البقر BSA في تفعيل عملية التضخيم نماذج DNA القديمة وكذلك نماذج DNA الحاوية على مثبطات لعملية الكوثرة مثل الميلانين Melanin .
- الكليسرول يساعد في منع تجمع جزيئات إنزيم الكوثرة ومنع التصاق مواد خليط التفاعل الى جدران الأنابيب ، ويساعد في عملية تضخيم الأهداف ذات المستوى العالي من GC .
- PEG تساعد هذه المادة على التضخيم بشكل خاص عندما تكون تراكيز قالب DNA واطئة جدا .

ومن المواد التي يمكن ان تدخل التفاعل عن غير عمد مادة SDS وهذه حتى عند تراكيز واطئة 0.01٪ المتخلفة من عمليات استخلاص قوالب DNA فانها تقلل من فعالية Taq بنسبة 10٪ . اما التراكيز الأقل فتكون غير مؤثرة والتراكيز الأعلى يمكن ان تؤدي الى استنزاف كلي لفعالية الإنزيم ويمكن في بعض الحالات معادلة التأثير السلبي لها ومعادلته بإضافة المنظفات غير الأيونية مثل Tween 20 او Tween 40 بتركيز 0.5 ٪ .
اما وجود اليوريا وتأثيراتها فيعتمد على التراكيز فهي يمكن ان تزيد من فعالية إنزيم Taq عندما تكون بتراكيز1 -1.5مولر وبعد ذلك يبدأ تأثيرها السلبي بالظهور عند زيادة التراكيز . ومن الجدير بالذكر ان المضافات تساعد في تسهيل عملية التضاعف ويفترض ان تقلل من درجة حرارة الانصهار Tm لقطع DNA المستهدفة ذات المحتوى العالي من GC لانها تحتاج الى ظروف مسخ قاسية لصهرها وإنتاج الأشرطة المفردة .
وعلى العموم فان المضافات المذكورة وغيرها يمكن ان تستعمل في المستحضرات المستعملة ولكن لا تعلن عنها الشركات بشكل واضح .

الخليط الرئيس Master mix

ويسمى ايضا Premix من قبل بعض الشركات ويمثل خليط كل المكونات والعوامل الضرورية لتفاعلات الكوثرة ما عدا الإنزيمات او قوالب DNA وجمعه بهذا الشكل لتقليل من الأخطاء في إضافة المكونات والحجوم أثناء عملية السحب Pipetting وكذلك لتسهيل واختصار وقت خلط مكونات تفاعل PCR .

تفاعل الكوثرة

تفاعلات الكوثرة التي تحاكي نظيرتها في الأنظمة الحيوية تتم في أنبوبة اختبار واحدة ، وقد احتاجت المحاكاة الى درجات حرارة مختلفة لتلاؤم الظروف الخارجية . وهي موضحة في المخطط الآتي :



القواعد المكملة لأشرطة القالب ترتبط الى الطرف ' 3 منه والإنزيم يضيف النيوكليوتيدات الى الطرف '3 متجها الى الطرف '5 . وتعاد العملية عدة مرات لإعطاء الناتج ولكن يجب تذكر ان اغلب التفاعلات تصل كفاءتها الى 98٪ وهذا يعني في كل إضافة للقاعدة فان 98٪ من الجزيئات ستسلم القاعدة . ونظرا لان أشرطة DNA يتم مسخها فان نواتج الكوثرة تكون تزايدية أي زيادة في الهدف المعرض لعملية التضخيم .

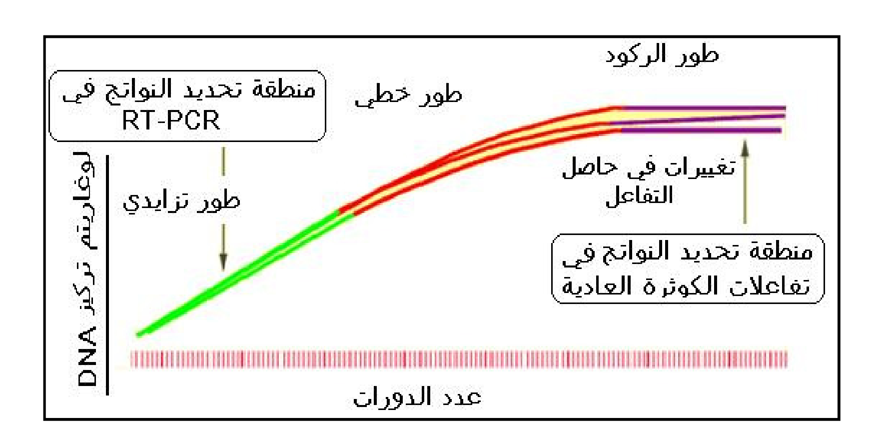
فالملاحظ ان مضاعفة DNA داخل الخلايا يسير في اغلب الأحيان بدون أخطاء تذكر وتحت درجة حرارة ثابتة ، ولكن في الأنبوبة فرضت العديد من الظروف للوصول الى ما يشبه النتيجة الحاصلة في الأنظمة الحيوية . فالملاحظ ان تفاعل الكوثرة PCR يضخم حوالي 100 – 1000 قاعدة وتضخيم قطع اكبر يكون صعبا من الناحية التقنية ويحتاج الى تحوير وحرف الظروف عن الطريقة التقليدية . كما ان الاختلاف في نوعية القوالب يؤدي

الى إضافة او حذف خطوة او أكثر . ولعل أهم مظاهر التفاعل هو الاختلاف بدرجات حرارة التفاعل التي تتخذ نسقا كما موضح في الشكل (3) المذكور سابقا .

أطوار التفاعل

في بداية التفاعل تكون المواد موجودة بوفرة كافية ما عدا DNA القالب والنواتج ، ويبدأ التفاعل الذي يتخذ نمطا تزايديا ، اذ ان كل جزيئة مخلقة جديدة في الدورة تعمل قالبا لدورات التفاعل التي تليها ، ثم يلي ذلك تغير في نمط الزيادة لتصبح خطية ، ونقطة دخول التفاعل الى النمط الخطي فيها اختلافات كثيرة حتى بين المكررات للنماذج نفسها . ونقطة التحول هذه ناجمة عن تزاحم القوالب (القديمة والجديدة) للارتباط بالباديء الذي يفترض ان يكون قد أضيف بكميات وافرة ولكن محددة ، فضلا عن أسباب تعود الى الإنزيم وبيئة التفاعل وذلك لان إضافة المزيد من الإنزيم لا يؤثر في سير التفاعل .

في تفاعل PCR التقليدي يتم الكشف عن النواتج النهائية End- point ومجريات التفاعل تتم بأطوار مختلفة وهي الموضحة في الشكل 10 .



شكل 10 : أطوار التفاعل

يلاحظ من الشكل ان التفاعل يتم بأطوار

الطور ألتزايدي : وفيه يحصل تضاعف لجزيئات DNA القالب والنواتج التي تتراكم عند كل دورة ، على افتراض ان المواد المتفاعلة تكون موجودة بوفرة اي تخلط بمولارية زائدة لكل المكونات في داريء ملائم وان التفاعل يسير بكفاءة (افتراضا) تصل الى حوالي 100٪ وفي هذه لحالة يكون التفاعل مضبوطا ومتخصصا عند غياب المؤثرات لينتج في النهاية بعد 30 دورة جزيئات DNA أكثر من بليون نسخة كما موضح في الجدول الأتي(جدول 3)

جدول 3 : عدد نسخ جزيئات DNA الناتجة بعد التضاعف لثلاثين دورة

عدد الدورات (n)	عدد نسخ DNA المتكونة (2^n)
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1024
20	1048576
30	1073741824

وتمثل n عدد الدورات .

الطور الخطي : وهذا الطور تكون فيه تغايرات كثيرة حتى بين مكررات النموذج الواحد وهذا يعني ان السمة التزايدية هي محدودة مما يشير الى ان النظام بدأ يعمل بأقل من القابلية القصوى له وذلك يعود الى عدة أسباب :

1) بعض أشرطة القالب سوف تصبح غير متاحة للتكثير نتيجة وجود كسور او فشل في فكها الى أشرطة مفردة وقد يعود الفشل في الانفكاك الى وجود بعض البروتينات المتبقية من عمليات التنقية .

2) ان كمية إنزيم الكوثرة محدودة ولا تواكب العدد الكبير من الأشرطة المفردة الناتجة او بسبب قلة فعاليته .

3) حصول تنافس للأشرطة الجديدة على البوادىء وإمكانية ارتباطها مع بعضها نتيجة التكامل ، اذ ان التفاعل يشهد عمليات تنافس كبيرة لا يمكن حدسها .

4) استهلاك مكونات التفاعل من نيوكليوتيدات وايونات ومواد أخرى التي تصبح بوفرة اقل بكثير مما كانت عليه عند البداية .

5) بدء نواتج التفاعل بالتفكك .

طور الركود او الهضبة Plateau : وتمثل الدورات الأخيرة ويصل معدل التضخيم الى الصفر، وهي تمثل النواتج التي يتم الكشف عنها بالترحيل الكهربائي او غيرها من الطرق . ولا تفيد محاولات جعل التفاعل مستمرا بإضافة كميات جديدة من الإنزيم او

المكونات الأخرى لان بيئة التفاعل تكون قد تغيرت بشكل كبير . وهذه الحالة تعود الى أسباب عدة منها تفكك المواد المتفاعلة مثل dNTPs وإنزيمات الكوثرة ، وكذلك نفاد المواد المتفاعلة مثل البوادىء خاصة للنواتج القصيرة او نفاد dNTPs بالنسبة للمواد او القطع الطويلة . فضلا عن امكانية حدوث التثبيط بنواتج التفاعل نظرا لتكوين Pyrophosphates ، والتنافس بين المواد المتفاعلة خاصة من قبل النواتج غير المتخصصة .

عدد الدورات

يعتمد عدد الدورات المستعملة على عدد من الظروف منها عدد نسخ قالب DNA المراد تضخمه . والملاحظ من الشكل (شكل 10) ان الدورات تكون ذات تأثير فاعل في زيادة كمية الحاصل في الأطوار الأولى لذلك يوقف التفاعل عند انتهاء الطور ألتزايدي او عند الطور الخطي لانه لا فائدة من الاستمرار في زيادة الدورات ، ويكون الوقت بحدود 3 ساعات . ويمكن زيادة عدد الدورات عن الحد التقليدي 20 –30 دورة تحت ظروف خاصة لتصل من 35– 40 دورة . كما في حالة وجود مثبطات إنزيمات الكوثرة او وجود قوالب DNA خاصة حاوية على تراكيب ثانوية معقدة وغيرها من الأسباب . ومن أهمها الإنزيمات المستعملة ، فمثلا إنزيم Taq الشائع الاستعمال يكون العمر النصفي له حوالي 30– 40 دقيقة عند درجة 95 ْ م ، لذا لا يفضل التضخيم أكثر من 30 دورة عند درجة حرارة مرتفعة .

النسق الحراري لتفاعل الكوثرة

من المعروف ان تفاعل الكوثرة يمتاز عن الكوثرة الحيوية التي تتم داخل الأنظمة الحية بالتغير بدرجات الحرارة لأداء مهام مختلفة ، وبذا يكون له نسقا حراريا مختلفا ، ومن الجدير بالذكر ان كل خطوة في تفاعل الكوثرة تكون حساسة لدرجات الحرارة . ومن النقاط الواجب التوقف عندها الآتي :

- هناك معاملات حرارية قبل البدء بالتفاعل ، وهذه يتم تطبيقها على بعض النماذج لأغراض خاصة ، فتسخن النماذج الحاوية على إنزيم كوثرة ثابت بالحرارة الى درجة 94 – 96 ْم وبعض الأحيان الى درجة 98 ْم ويمكن ان تستمر 1 – 10 دقائق ، وهذه المعاملة تؤدي الى أكثر من غرض منها تثبيط الإنزيمات مثل DNase I او Proteinase K او غيرها الآتية بشكل طبيعي من النموذج او من جراء تهيئة النموذج ، فضلا عن تنشيط إنزيم الكوثرة المحور في بعض الحالات ليلاءم عملية البدء الساخنة Hot- start .

المسخ Denaturation

يسمى ايضا انصهار أشرطة DNA وفيه يتم كسر الأواصر الهيدروجينية التي تربط الشريطين ويكون المسخ على أكثر من صعيد ، في البداية يتم مسخ أشرطة DNA القالب (الأصلي) وتحويلها من أشرطة مزدوجة الى أشرطة مفردة وذلك بالتسخين بدرجة حرارة حوالي 94°م او استعمال 96 – 97 °م وذلك لان من المعروف ان تسخين DNA في داريء يحوي على الاملاح تكون الحرارة الملائمة اقل من 100° م لذلك تستعمل درجات حرارة تتراوح بين 91-97° م ويمكن ان تطول مدة التسخين الى دقيقة ويفضل إضافة دقيقة الى الوقت في حالة القوالب المعقدة اي يعتمد على المواصفات التركيبية للأشرطة لكسر الأواصر الهيدروجينية بين القواعد النتروجينية التي تكون في حالة A=T اضعف من G≡C .

ويمكن تخفيض حرارة المسخ بعد حوالي 10 دورات عندما تصبح أهداف DNA الشائعة اقصر مما كانت عليه في البداية . فمثلا لأهداف بطول 300 قاعدة او اقل فان حرارة المسخ تخفض الى 88° م لجزيئات تحوي على 50٪ من GC وبذلك يمكن ان يزاد من عدد الدورات الى 40 دورة دون التأثير في كفاءة الإنزيم . ويمكن لعملية المسخ ان تتم بتأثير المواد الكيماوية مثل اليوريا .

وتستعمل عملية المسخ لدراسة بعض مواصفات DNA فمثلا درجات المسخ العالية تعني محتوى اكبر من C.G وتستعمل في تحديد المسافة الوراثية بين الأنواع بطرق التهجين وتستعمل ايضا لأغراض أخرى ضمن طرق محددة ، فضلا عن استعمالها في الخطوة الأولى من تفاعل الكوثرة . وفي الحالة الأخيرة يتم التسخين لمدة تتراوح بين 15 – 20 ثانية ، وقد ترفع درجة حرارة المسخ الى °98م في حالات خاصة مثل كون القالب طويل او يحوي على تراكيب ثانوية . وأثناء المسخ تتوقف الفعاليات الإنزيمية اي عمليات الإطالة من الدورات السابقة لتستأنف بعد توقف قصير .

درجة حرارة الالتحام (Ta) Annealing temperature

الالتحام تعني في الوراثة ان كل من أشرطة DNA المفردة او RNA يلتحمون لتكوين أشرطة مزدوجة بواسطة الأواصر الهيدروجينية بين القواعد المتكاملة ، وعادة تستعمل لربط مجسات DNA او لربط البادئ الى قالب او هدف DNA في تفاعلات الكوثرة (وهي محور المناقشة هنا) او تستعمل لإلغاء المسخ Renaturation للأشرطة المتكاملة التي مسخت حراريا .

وفي خطوات تفاعل الكوثرة وبعد فك الأشرطة المزدوجة الى أشرطة مفردة يتم تخفيض الحرارة لخليط التفاعل الى مدى 50 -65°م لمدة 20 -60 ثانية والشائع هو استعمال 60

ثانية للسماح للبواديء بالالتحام الى أشرطة DNA المفردة ، وهي بشكل عام اقل بـقدر 3 –6 ْم من حرارة الانصهار Tm (التي سيأتي ذكرها لاحقا) ، وأثناء العملية تتكون الأواصر الهيدروجينية في حالة تكامل قواعد الباديء مع الشريط الهدف ولمدة 20 ثانية بعد ان تكون البواديء قد تجولت بالحركة البراونية بحثا عما يكملها ، وفي هذه الحالة فان تكوين الأواصر الثابتة يدوم أطول لإتمام العملية اللاحقة وبعد ارتباط عدد قليل من القواعد تصبح الأواصر الأيونية بين القالب والباديء قوية ولا تتكسر بسهولة اما الأواصر غير الثابتة فتتكسر سامحة لجزيئات الباديء بالبحث الجديد عما يكملها .

وتتأثر حرارة الالتحام بدرجة حرارة الانصهار ويجب ان تكون حرارة الالتحام ضمن مدى معين ، فحرارة الالتحام Ta العالية والتي يمكن ان ترفع لتصل درجة الإطالة وهي حوالي 70 ^{o}م (كما سيأتي ذكره) تؤدي الى تهجين غير ملائم بين القالب والباديء وبالتالي تؤدي الى قلة حاصل التفاعل ولكن المحافظة عليها يمكن ان يقلل من التضخيم الزائف في بعض الأحيان ، اذ انها تشجع التخصصية ، اما الواطئة والتي يمكن ان تصل الى 37 ^{o}م فانها يمكن ان تؤدي الى تكوين مزدوجات الباديء او نواتج غير متخصصة تنتج عن وجود عدد كبير من حالات عدم التلاؤم Mismatch وذلك لان تحمل عدم التلاؤم يكون محدودا وله تأثير كبير في تخصص تفاعلات الكوثرة .

وعدم التلاؤم يكون مضرا ويؤدي الى اضطراب التوزيع الفراغي Geometry للنيوكليوتيدات والارتباط يكون غير مفضلا من ناحية حسابات الطاقة . اي يحصل التحام غير متخصص ويكون الوضع أكثر خطورة عندما يحدث في الخطوات المبكرة من التفاعل لأنه سوف يطغى على اي تواليات متخصصة نظرا لان تفاعلات الكوثرة ذات طابع تزايدي . ويفضل ان تكون حرارة الالتحام لكل من الباديء الأمامي والعكسي متقاربة جدا ، لان الاختلاف يؤدي الى إعطاء حاصل قليل ، كما يمكن ان يؤدي الى حصول تفاعل غير متناظر أي يتم تضخيم احد الأشرطة على حساب الآخر . وعلى العموم فان اغلب البواديء تلتحم في مدة حوالي 30 ثانية تحت الظروف الملائمة للتفاعل . ودرجة حرارة الالتحام تعتمد على درجة الانصهار للبواديء وقد وضعت معادلات لحسابها :

$$Ta = 0.3 \times Tm(primer) + 0.7 \times Tm(product) - 14.9$$

وتمثل :

Tm (primer) درجة حرارة الانصهار لأقل مزدوج (من حيث الثبوت)

Tm (product) حرارة انصهار نواتج PCR

وTa هي في العموم تكون اقل بـ 5 ^{o}م من حرارة الانصهار ، وعند حسابها بالنسبة لحرارة الانصهار فيمكن استعمال المعادلة الآتية :

$$Ta = Tm \text{ (of the lowest primer)} - 4° C$$

وهذه هي الأفضل ولكن بعض الأحيان تحتاج الى ان تحدد بالتجربة .

وفي حالة ملاحظة حزم غير مرغوب فيها يتم التلاعب بدرجة حرارة الالتحام ضمن ما يسمى بطريقة الهبوط Touchdown method وتبرمج الطريقة بعمل دورات متعاقبة من تفاعل الكوثرة تخفض فيها الحرارة . ويتم البدء بدرجات حرارية أعلى من درجة الانصهار Tm بحوالي 10 °م ثم تخفض بمعدل 2 – 5 °م لعدد من الدورات . ففي الدرجات العالية يلتحم البادىء بتخصص عالي اي ان البادىء سوف يرتبط في الأغلب الى التوالي المطلوب والذي سيتم تضخيمه في الدورات اللاحقة بعد تخفيض الحرارة . وعليه يمكن تقسيم هذه البرمجة الى مستويين الأول استعمال حرارة أعلى 10° م من حرارة الانصهار المحسوبة ثم تخفض بمعدل 1 °م لكل دورة ، وهكذا نزولا الى الدرجة المثلى ، وأحيانا تخفض درجة حرارة الالتحام اقل من المثلى في الدورات النهائية للحصول على حاصل PCR بكمية كبيرة . ويمكن ان يغطي المدى الحراري 15° م .

وتوجد بعض الأجهزة التي يمكن برمجتها ليكون الانخفاض فيها 0.5° م /دورة ، وأجهزة أخرى تستعمل برمجة تهدف الى استعمال 7 من الدورات بعد تخفيض الحرارة الى 2° م عن حرارة الانصهار ثم استعمال 5 دورات بعد تخفيض الدرجة 3 °م . وزيادة عدد الدورات عند درجة حرارة معينة الى مدى 3–4 دورات سوف يمكن الهدف من التنافس قبل عملية ارتباط البادىء Priming غير المرغوبة في التضخيم . وعند استعمال دورات إضافية فانها يجب ان تحذف من عدد الدورات النهائي للبرنامج للتخلص من التدوير Cycling الفائض الذي يرافقه عمليات تفكك النواتج وإنتاج مسحة ذات وزن جزيئي عالي عند الترحيل الكهربائي ، وتخفيض الحرارة بطريقة الهبوط المذكورة آنفا يجب ان لا تتعدى 35 دورة في عامة الأحوال وقد لا تؤدي الى نتيجة مقبولة لذلك يمكن ان تعاد البرمجة وتضبط الظروف الأخرى المشاركة .

تستعمل طريقة الهبوط الحراري TD عند وجود البوادىء المشتتة وكذلك البوادىء التي فيها عدم تلاؤم واضح مع القوالب لذلك يتم البدء بحرارة عالية والنزول بدرجات الحرارة على مدى 15 °م الى حين الوصول الى الدرجة الملائمة وبعدها لا تكون هناك فائدة من الاستمرار في تخفيض درجات الحرارة . ولكن يجب تذكر ان بعض البوادىء تكون عصية من ناحية درجة الالتحام المثلى وعندها يجب تصميم بادىء آخر يتكامل مع قطعة DNA مجاورة .

وبذا يتضح ان استعمال طريقة الهبوط تفيد وذلك لان البدء بدرجات حرارية عالية لمنع التداخلات غير المتخصصة خاصة في الدورات المبكرة من التفاعل . وتكون طريقة الهبوط ملائمة للتفاعلات المنفردة Monoplex أكثر من التفاعلات المتعددة Multiplex .

حرارة الانصهار Tm

تعني هنا انصهار البواديء من النواتج اي كسر الأواصر الهيدروجينية بينهما وهي التي تكون عندها نصف مزدوجات DNA مفككة (اي بشكل أشرطة مفردة) وتتم برفع درجة الحرارة تليها عملية تبريد مباشرة . وحرارة انصهار البادىء تقيس مدى ثبوت الهجين (DNA- DNA) وتكون مهمة في تحديد حرارة الالتحام بين البادىء و DNA القالب . وتوجد أكثر من طريقة لحسابها .

فالنسبة للبواديء بطول حوالي 14– 20 قاعدة يمكن استعمال معادلة Wallace :

$$Tm = 2(A+T) + 4(G+C)$$

اما في البواديء الأطول فيصار الى استعمال حسابات الجوار الأقرب Nearest –neighbor التي تأخذ بنظر الاعتبار مؤشرات الحركيات الحرارية Thermodynamics وهي الطريقة المستعملة في اغلب برامج تصميم البواديء الموجودة في الوقت الحاضر .

وفي طريقة الجوار الأقرب يؤخذ بنظر الاعتبار ان التداخل بين قاعدتين على أشرطة مختلفة يعتمد على القواعد المجاورة ، فبدلا من معاملة حلزون DNA على ان خيط من التداخل بين أزواج القواعد بشكل مفرد ، فان هذه الطريقة تتعامل مع الحلزون على انه خيط من التداخلات بين القواعد والأخذ بنظر الاعتبار القواعد المتجاورة اي انها تعنى بالأواصر بين القواعد المتجاورة ايضا. ففي الشريط الآتي :

5′ C_↓_ G_↓_ T_↓_ T_↓_ G_↓_ A 3′

5′ G____ C____ A____ A____ C____ T 3′

كل آصرة تحتاج الى قيم معينة من الطاقة والتي بدورها تمتلك كمية من Enthalpy (H) الذي يمثل التغير في المحتوى الحراري (السخونة) ، وEntropy (S) وهو مقياس الطاقة العشوائي او ما يسمى مقياس الفوضى للمواد اي الطاقة غير المستفاد منها في نظام حركي حراري . ΔS تقاس بوحدة Kcal /mole وتمثل الفرق في مقياس الفوضى للطاقة . وطريقة الجوار الأقرب تأخذ بنظر الاعتبار تركيز الأملاح . والمعادلة العامة المستعملة :

$$Tm = \frac{dH}{dS + R\ln\ (C/4)} + 16.6 \log_{10} [K^{+}] - 273.15$$

dH هو Enthalpy

dS هو Entropy

C التركيز المولاري DNA

$[K^+]$ التركيز المولاري للأملاح (والقيم الأصلية التي تستعملها معظم البرامج هي 50 ملي مول) .

R تمثل ثابت الغاز (1.987 Cal*k/mol)

Natural log : ln

ان حرارة الانصهار Tm تعتمد على عد من الظروف منها طول جزيئة DNA ومكوناته من القواعد ، وكذلك حالة وجود عدم التلاؤم ، فكل حالة واحدة من عدم التلاؤم تخفض حرارة الانصهار حوالي 5 °م ، وتتأثر ايضا بمكونات الداريء المستعمل ، وكذلك تركيز القالب والباديء ، لذلك تكون القيم المحسوبة هي قيم تقريبية وعندها تؤثر في تحديد حرارة الالتحام ، لذلك يتم اللجوء الى استعمال طريقة الهبوط لتحديد حرارة الالتحام .

ومن الطرق الأخرى لحساب حرارة انصهار البواديء

$$Tm\,(°K) = \{\Delta H/\Delta S - R\ln(C)\}$$

عند استعمال درجات كالفن Kelvin المطلقة

او عند استعمال درجات الحرارة السليزية

$$Tm\,(°C) = \{\Delta H/\Delta S - R\ln(C)\} - 273.15$$

C تركيز الباديء

وفي حقيقة الأمر لا توجد طريقة يمكن ان تقيس حرارة الانصهار بشكل مضبوط وإنما كل الطرق تعطي قيم تقريبية ، ولكن في العموم هناك إشارات الى ان الدرجات الحرارية العالية مثل 65-70° م يمكن ان تؤدي الى تكوين الكواذب وظهور حالات يصعب التعامل معها خاصة عند تحديد التواليات . ومن الواضح ان محتوى الباديء من GC يعطي صورة واضحة عن حرارة الانصهار وبالتالي حرارة الالتحام ، فضلا عن حقيقة ان البواديء التي لها درجات التحام عالية مثل 65° م تميل الى حصول عمليات التحام ثانوية . ويفضل ان يحتوى كل شطر من زوج البواديء على محتوى متساوي من GC وبأطوال متشابهة للوصول الى درجات صهر متشابهة وإعطاء نتائج أفضل . اما فيما يتعلق بمدة التسخين فهي أيضا تعتمد على مؤشر الطول والمحتوى من GC ، فهي يمكن ان تقصر الى 30 ثانية ، ويمكن التلاعب بالوقت والحرارة فعندما تكون الحرارة عالية يقصر الوقت والعكس صحيح .

وفضلا عما ذكر أعلاه فهناك معادلات أخرى يمكن ان تحسبها وهناك معادلات أخرى يمكن ان تستوعب تواليات باديء من 20-100 قاعدة التي تستعمل لأغراض خاصة .

ومن الجدير بالذكر ان حرارة انصهار أشرطة DNA يمكن ان تستعمل في مجالات غير تفاعلات الكوثرة . والتحليلات المعتمدة على حرارة الانصهار لها مساوئها نظرا لعدم

إمكانية تحديدها بشكل مضبوط جدا . لذلك لا يمكن ان تحل محل دراسة التواليات ولكن يمكن ان تستعمل كبديل لموازنة قوة التهجين لمجموعة من الجزيئات من مجسات Oligonucleotides في مصفوفات DNA الدقيقة DNA microarrays .

حرارة الإطالة Extension temp

بعد السماح بعملية الالتحام يتم رفع درجة الحرارة الى درجة تتراوح بين 60 -75°م ولو ان الاستطالة تحصل من لحظة حصول الالتحام اعتمادا على إنزيم الكوثرة ليبدأ فعاليته بارتباطه الى هجين البادىء مع القالب وإضافة النيوكليوتيدات على البادىء بإملاء من الشريط القالب بعد ان يكونا قد ارتبطا بشكل قوي وإطالة الشريط متجها بعيدا عن البادىء كما موضح في الشكل 9 أعلاه .
وهذه العملية تحتاج حوالي 30 ثانية اعتمادا على إنزيم الكوثرة المستعمل وطول قالب DNA . ثم بعد ذلك تبدأ دورة جديدة وذلك بمسخ الأشرطة المزدوجة المتكونة ليعمل كل شطر منها كقالب للدورة الجديدة . وعملية الاستطالة تحدث بالدرجة الملائمة لعمل إنزيم الكوثرة ونادرا ما تحتاج الى تعديل . ويحدث بعض الأحيان دمج خطوة الالتحام مع الإطالة لتكون باستخدام درجة حرارة بين 60 -70° م ولكن في هذه الحالة يفضل زيادة عدد الدورات لتصل من 25 -45 دورة . وبلغة الأرقام المقترحة تحصل الاستطالة بمعدل 100 قاعدة \ ثانية أي حوالي كيلو قاعدة \ دقيقة ، والأهداف الطويلة تحتاج وقت استطالة أطول مثلا 3 قالب بطول كيلو قاعدة تحتاج الى 3 دقائق .

حرارة انصهار نواتج الكوثرة

عملية صهر الأشرطة الجديدة يمكن ان تحدد بالمعادلة التالية :

$$Tm\ (\text{product}) = 0.41 \times \%\ GC + 16.6 \times \log_{10} [K^{+}] - 675/\text{length} + 81.5$$

والطول length يمثل عدد النيوكليوتيدات في نواتج الكوثرة .

الإطالة الأخيرة

او الخطوة النهائية لتفاعل الكوثرة الذي تم بحرارة 70 -74° م اي المقاربة للحرارة التي يعمل بها إنزيم الكوثرة وتكون بحدود 5 -15 دقيقة بعد أخر دورة من دورات التفاعل لضمان ان كل الأشرطة المفردة يتم تحويلها الى أشرطة مزدوجة . ثم تلي ذلك خطوة مسك او وقفة عند درجة حرارة 4 – 15º م وتمثل عملية خزن وبعد ذلك يتم فصل النواتج بالترحيل الكهربائي في الهلام .

الظروف المؤثرة في تفاعل الكوثرة

يعتمد نجاح عملية الكوثرة على وجود نسبة عالية بين عمليات الالتحام المتخصصة وعمليات الالتحام غير المتخصصة . وعمليات الالتحام ونجاحها يعتمد على مكونات داريء الكوثرة وخاصة الايونات الموجبة التي يحويها وحرارة الالتحام ومن المعروف ان عملية الكوثرة تحتاج الى معلومات مسبقة عن الأهداف والنواتج ، ولكن بعض الأحيان يمكن ان يستعمل تفاعل لكوثرة لتضخيم تواليات غير مميزة . وفي الحالتين تكون نواتج التفاعل الواحد كميات قليلة مقارنة بالكميات التي يمكن الحصول عليها من الكلونة داخل الخلايا التي يكون فيها عمليات التوسيع ممكنة ، فضلا عن اختلاف كفاءة الكوثرة من قالب الى آخر .

وهناك العديد من الظروف المؤثرة في كفاءة تفاعل الكوثرة ، وأكثرها تأثيرا هو إنزيم الكوثرة ، فالإنزيم موجود بشكل طبيعي في الأحياء ويقوم بعمليات التضاعف وإصلاح DNA ويتأثر بالظروف الداخلية وكل عمليات التضاعف السليم في الأنظمة الحية يعتمد على هذه الفعالية أثناء نمو وانقسام الخلايا ، ومبكرا استعمل Klenow unit من إنزيم DNAP I من *E. coli* ليقوم بعملية التفاعل بدرجة 37 ºم واستخدم في تضخيم قطع محددة من الجينوم البشري ولكن تفاعلاته غير متخصصة ولذلك ترك في الوقت الحاضر كما مر إيضاحه في موقع آخر . ومن الظروف المؤثرة في الاستعمالات في الوقت الحاضر وبعد استعمال الإنزيمات المقاومة للحرارة يلاحظ انه لا توجد ظروف موحدة لإجراء عمليات التضخيم ، لذلك فان المؤشرات من وقت ، ودرجات حرارة ، وتراكيز مكونات خليط التفاعل يجب ان يتم التأكد منها في كل حالة ضمن المديات المقترحة المذكورة للحصول على أفضل حالة تضخيم للأهداف المطلوبة . وبالرغم من ان عطاء PCR هو تزايدي نظريا الا ان الحاصل الحقيقي او العملي يكون اقل مما يشير الى ان النظام يعمل بكفاءة اقل من القابلية القصوى له . ولإنجاح عملية الكوثرة التقليدية فان معرفة النتائج المتوقعة تكون ضرورية وكذلك معرفة النماذج الحاوية على أهداف DNA . فبالنسبة للنماذج الحاوية على mRNA فان العملية تحتاج الى النسخ العكسي وان البواديء تصمم للاكسونات والانتباه الى ان البادئين يكون كل منهما واقعا على اكسونات مختلفة في mRNA ، فضلا عن هذا يجب تجنب تضخيم نواتج غير مطلوبة موجودة كملوثات في مستحضرات mRNA . كما ان البواديء تصمم لتضخيم قطع صغيرة عندما يراد استعمال الأخيرة كمجسات . والانتباه الى ان نواتج تفاعل الكوثرة المراد استعمالها في

الكلونة تضاف لها مواقع التميز للإنزيمات القاطعة اذا لم تكن حاوية عليها ، ومثل هذه القطع تتراوح بين 150 –1000 قاعدة ويمكن ان تكون من الأنسجة المثبتة او DNA النقي من البلازميدات او gDNA . لذلك تشكل مسألة معرفة النماذج والمتوقع من نواتجها احد الركائز المهمة في أمثلة عملية تفاعل الكوثرة . وإضافة الى ذلك هناك بعض الظروف المؤثرة منها .

حجم نموذج التفاعل

في تفاعلات الكوثرة يتم استعمال 5 – 100 مايكرولتر في أنابيب حجمها بين 0.2 – 0.5 مللتر . وبعض الأحيان يمكن استعمال حجم 5 مايكرولتر اما الأحجام الأكبر من 100 مايكرولتر فلا يوصى بها لانها تؤثر بشكل سلبي في عملية التفاعل وفي حالة استعمالها لابد من إطالة مدة الحضن لضمان الحصول على توازن حراري لخليط التفاعل ولذلك وكلما قل حجم خليط التفاعل أمكن الوصول الى التوازن الحراري بسرعة وسهولة . والأنابيب المستعملة تكون رقيقة الجدران وبها أغطية متصلة بها لضمان انتقال الحارة بكفاءة ومنع التبخير . ويستعمل الكليسرول او الزيت المعدني في النقل الحراري وعندما يراد الحصول على كميات كبيرة من نواتج التفاعل يفضل عدم زيادة حجم التفاعل الواحد وإنما الإبقاء على حجم 50 مايكرولتر ولكن بمكررات .

تركيز البواديء

تعمل البواديء بشكل جيد عند تركيز 0.1 -1مايكرو مول (والأفضل 0.2 مايكرو مول) للحجوم المذكورة أعلاه ، ولكن عند وجود درجة عالية من التشتت في نوعية البواديء المستعملة يزاد التركيز الى 1 مايكرو مول .

عدد الدورات

يعتمد عدد الدورات على بعض المؤشرات منها كمية القالب وعدد جزيئاته التي يفضل ان تكون صغيرة فمن البديهي ان البدء بجزيئة واحدة يحتاج دورات أكثر للوصول الى الكمية الممكن التعامل معها وهي بحدود 20 نانوغرام من DNA مقارنة بالبدء بأضعاف هذه الكمية عند استعمال gDNA الذي يمكن ان يصل الى 100 نانوغرام في حجم 25 مايكرولتر .

وبعض المؤشرات الأخرى التي تؤثر في عدد الدورات :

- نوعية الإنزيم المستعمل لتخليق DNA .
- تركيز الايونات ثنائية التكافؤ (Mg^{++}) .
- تركيز dNTPs.
- حرارة الانصهار.

وغيرها من المؤثرات

كما ان نوعية التفاعل تؤثر في عدد الدورات ، فمثلا عند استعمال تفاعل كوثرة العنقدة يمكن الاكتفاء بحوالي 20 دورة في الخطوة الثانية بدلا من 30 -35 دورة وهذا سيساعد في تقليل فرص توليد حزم ذات وزن جزيئي عالي وغير مرغوب فيه او تكوين المسحات في هلام الترحيل الكهربائي ومثل هذه الكواذب عادة تحوي على أشرطة مفردة من DNA ويبدو انها ناجمة عن عدم ارتباط البواديء الصحيح لنواتج DNA المتضخمة في الدورات المبكرة . كما ان الدورات يمكن ان يزداد عددها عند احتواء النماذج على مثبطات للإنزيم او اي معوقات أخرى لتفاعل الكوثرة .

تركيز النيوكليوتيدات

يكون من الضروري الحفاظ على تراكيز dNTPs بمستوى أعلى من Km لكل dNTP لان عدم توازن تراكيزها يؤثر سلبا في إنزيم الكوثرة ، ويجب ان تكون متوازنة مع عمليات اندماج النيوكليوتيدات . وقد وجد عند تقليلها يمكن ان تزيد قابلية الإنزيم Taq على إدماج القواعد الخطأ ولكن اذا رافقها تلاعب بتركيز المغنسيوم وتقليله يمكن ان تزداد دقة Taq . وفي التفاعلات العامة يكون التركيز المستعمل بين 50-500 مايكرومول (والتركيز 200 مايكرومول هو الأكثر استعمالا) ، وقد وجد ان هذا التركيز وبوجود ايونات المغنسيوم الحرة (1.5 ملي مول) يمكن تعطي ناتج من DNA يصل الى 6-6.5 مايكروغرام التي يمكن الكشف عنها بالترحيل الكهربائي .

تركيز الأملاح

تشمل تركيز والصوديوم والمغنسيوم وتراكيز مكونات الدواريء وقد وضعت معادلات لحسابها ، فضلا عن وجود حاسبات على شبكة الانترنيت (كما سيأتي ذكره لاحقا) لوضع الحدود المثلى ، ومن المعادلات المستعملة

$$\Delta S\,(\text{Salt conc.}) = \Delta S\,(1M\ \text{NaCl}) + 0.368 \times N \times \ln\,[\,(Na^{+})\,]$$

وتمثل N عدد أزواج النيوكليوتيدات في البادىء أي (طول البادىء – 1)

$[(Na^{+})]$ تركيز الملح المكافئ مقاس بالملي مول (mM) ويحسب :

$[Na^+]$ = Monovalent ion conc. + 4 × Free Mg^{++} conc.

وفي الحقيقة ان لكل إنزيم كوثرة تركيز خاص من الايونات أحادية التكافؤ مثل K^+ والذي يتأثر بدوره بطول جزيئة القالب . فايون البوتاسيوم يثبت التحام البادئ (وحتى غير المتخصص) ، وكانت الدوارئ سابقا تحوي ايون البوتاسيوم ولكن وجد ان ايون الامونيوم (NH_4^+) وعند وجوده بشكل متوازن مع ايون البوتاسيوم يمكن ان يزيد من الالتحام المتخصص على مدى من درجات الالتحام ، ولذلك ظهرت دوارئ الجيل الجديد التي تحوي على KCl و $(NH_4^+)SO_4$. فالتداخل بين ايون البوتاسيوم والامونيوم يسمح بزيادة عملية التهجين على مدى من الدرجات الحرارية .

والآلية في ذلك ان ايون البوتاسيوم يرتبط بمجموعة الفوسفات على العمود الفقري للـ DNA وبذا يثبت عملية الالتحام بين البادئ والقالب ، في حين ان ايون الامونيوم يتداخل مع الأواصر الهيدروجينية الضعيفة خاصة عند عدم التلاؤم بين القواعد النتروجينية ويقلل ثبوتها . وبذا فان وجود الايونين يساعد في الحفاظ على نسبة عالية من الالتحام المتخصص مقارنة بالالتحام غير المتخصص على مدى واسع من الدرجات الحرارية . وأشارت الدراسات الى ان الدوارئ الحاوية على خليط من ايونات البوتاسيوم والامونيوم تقلل من أمثلة تركيز المغنسيوم او درجات حرارة الالتحام للأنظمة المختلفة من البادئ-القالب . لذلك بدأت الشركات بإنتاج دوارئ تحوي كبريتات الامونيوم لانها فضلا عما ذكر من فائدتها آنفا فهي تحفز فعالية إنزيمات الكوثرة وبالتالي زيادة الحاصل من التفاعل .

وجود المشجعات والمثبطات

يمكن ان تحصل تفاعلات غير متخصصة أثناء الإعداد وقبل الوصول الى درجة حرارة الإطالة وبناء DNA من قبل إنزيم الكوثرة ، ويمكن عندها إضافة بعض البروتينات الرابطة لأشرطة DNA (SSB DNA binding proteins) لزيادة تخصص التفاعل ، والأفضل هو منع إنزيم الكوثرة نفسه من العمل وهذه تكون اما بإضافة مثبطات او مضاهيات النيوكليوتيدات التي تثبط Taq عند درجات حرارية اقل من 40 ºم او ربط الإنزيم بأجسام مضادة ، وكلا الحالتين تعمل بشكل جيد مع طريقة البدء الساخنة Hot start PCR . واستعمال الأجسام المضادة التي تمنع إنزيم الكوثرة من العمل الى حين رفع درجة حرارة الخليط التي تؤدي الى مسخها (أعلى من 55º م) ثم تطلقه لها مساوئ اذ ان كل إنزيم يحتاج الى أجسام مضادة خاصة وبتوسيع العملية تصبح مكلفة ، والأفضل تحوير الإنزيم بطريقة يكون غير فعال بدرجة حرارة الغرفة اي استعمال طفرة حساسة للحرارة ، ويعود

للنشاط بعد الحضن بدرجة حرارة 95 º م لمدة 6 –15 دقيقة . كما يمكن هندسة بروتينات الإنزيم بحيث لا تعمل الا بدرجات حرارية عالية فقط .

حجم البادىء وحجم DNA الهدف

لأمثلة تفاعلات الكوثرة يكون استعمال البوادىء الصغيرة والتي تمتلك حرارة انصهار اقل مثل 54° م او أعلى توفر فرصة أفضل ، ولكن مثل هذه الأحوال تكون ملائمة عند استعمال البوادىء القصيرة العشوائية كما في وضع الخرائط للجينومات البسيطة . ولذلك فان البوادىء الأطول من 18 قاعدة تستعمل في تفاعلات الكوثرة العامة .

ومن جهة ثانية فان نوعية الهدف وحجمه يؤثر في نجاح تفاعل الكوثرة فمثلا عند استعمال cDNA وبغياب genomic DNA (gDNA) فان البادىء يمكن ان يقصر ويرافقه قلة في الارتباطات غير المتخصصة . ولكن يجب تذكر ان طول البادىء لا يشكل كل القصة لأسباب تعود الى Entropy ، فالبادىء القصير يمكن ان يرتبط بسرعة الى DNA المستهدف ويكون تركيب ثابت يمكن ان يرتبط إليه إنزيم الكوثرة ، ومن جهة ثانية فان بعض العمليات تحتاج الى بوادىء بطول 28– 35 قاعدة عند تضخيم تواليات يتوقع ان يكون فيها تباين كبير كما في حالة :

- تضخيم تواليات تشفر لجزيئات متقاربة جدا مثل نظائر البروتينات او عائلة من البروتينات في النوع الواحد او في حالة كلونة جينات متماثلة (Homogenous) من أنواع مختلفة .
- تضخيم تواليات الفيروسات مثل HIV-1 ، وذلك لعدم توقع وجود مجموعة من البوادىء التي تتكامل بشكل منضبط لكل القوالب من DNA الموجودة في جينوم الفيروس .

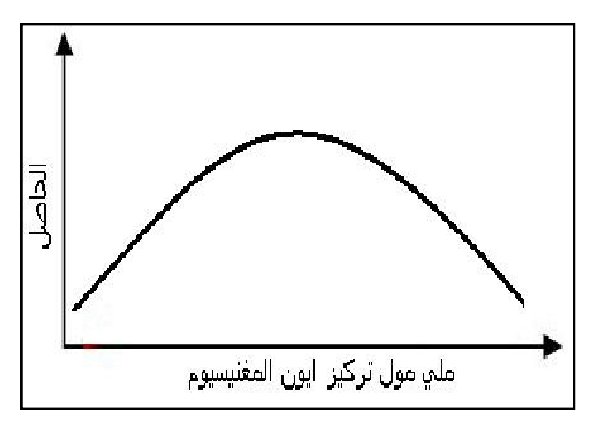
لذلك تتم دراسة البوادىء على الحاسوب *In Silico* باستعمال برامج الحاسوب Software لمقارنة التواليات المتوفرة لتحديد المناطق الأقل تغايرا الملائمة ، وهذه المناطق هي التي تشكل البداية لاختيار البوادىء .

اما عند النظر الى حجم الهدف والذي يفضل ان يكون كبيرا عندما يراد استعماله في الكلونة . فتركيز القالب له اثر كبير في تجانس نواتج PCR وتتأثر تخصصية التفاعل بعدد من العوامل منها : تركيز الإنزيم ، تركيز البوادىء ، مدة الالتحام ، مدة الإطالة (والأفضل إطالتها) وعدد الدورات ، تراكيز ونسب ايونات المغنسيوم الحر ، تركيز النيوكليوتيدات . كما ان بيئة التفاعل تكون مؤثرة لذلك يرفع الرقم الهيدروجيني عن الحد الطبيعي ،

فضلا عن مراعاة ظروف أخرى مثل استعمال المضافات مثل الكليسرول او DMSO وتقليل مدة مسخ أشرطة القالب واستعمال إنزيمات ذات قابلية على التصحيح .
وبصورة عامة عندما تكون الأهداف كبيرة الحجم (Long PCR) فهناك العديد من العوامل يجب ان تغير لغرض إنجاح التفاعل ويفضل للإسراع استعمال نوعين من الإنزيمات 2- polymerase system مثل استعمال Taq للاستفادة من سرعة تفاعله واستعمال إنزيمات أخرى مثل Pfu او Vent للاستفادة من قابليتها على الإصلاح .

تركيز ايون المغنسيوم

تكون التراكيز الموصى بها 1–4 ملي مول ويحدد بشكل دقيق بالبدء بـ 1.5 ملي مول ثم الزيادة بمعدل 0.5 مول لكل خطوة وعند حصر المدى المثالي ، يتم إجراء تجارب أكثر باستعمال زيادة تتراوح بين 0.2 – 0.3 ملي مول للوصول الى التركيز الأمثل .
وتركيز ايون المغنسيوم الحر يعتمد على ما يرتبط منه مع dNTPs و EDTA و Pyrophosphates (PPi) . ويؤدي المغنيسوم اكثر من دور ، فالجزء المرتبط مع dNTPs يؤدي اله تكوين معقدات ذائبة تكون هي المادة الاساس الحقيقية لانزيم الكوثرة ، ويساعد في تداخلات DNA/ DNA وبذا عند قلته تفشل البوادىء بالالتحام الى جزيئات DNA القالب . ، اما الجزء الحر منه فيكون مرافقا إنزيميا لإنزيمات الكوثرة وغيابه او نقصانه يؤدي الى تواري فعاليته . اما زيادته في خليط التفاعل فيؤدي الى تضخيم غير متخصص وتقل دقة فعالية الإنزيمات تتكون مزدوجات قوية بين القواعد ويصعب مسخها بشكل كامل حتى عند استعمال درجات حرارة 94–99 ْم في الخطوات اللاحقة . واعتماد التفاعلات على تركيز المغنسيوم يمثل علاقة جرسية الشكل Bell shape كما موضح في المخطط التالي ، مع قيم مثلى واسعة (وان كانت تعتمد على الإنزيم) كما موضح في الشكل 11.



شكل 11 : علاقة تركيز ايون المغنيسوم مع كمية الحاصل

واغلب الدراسات تستعمل ايون المغنسيوم بحدود 1.5-1.2 ملي مول في خليط التفاعل .

تداخل العوامل المؤثرة في تفاعل الكوثرة

ان العوامل المؤثرة في تفاعل الكوثرة لا يمكن ان تحور لتصبح مثالية إلا إذا اخذ بنظر الاعتبار تداخلها وتأثير بعضها في الآخر ، ومن هذه التداخلات على سبيل المثال :

- تركيز النيوكليوتيدات اذا زاد فإنها تسحب ايونات المغنسيوم ويؤدي قلة ايونات المغنسيوم الى عدم تكون النواتج لذا وجب ان تكون هناك زيادة معينة في تركيز المغنسيوم يفوق تركيز النيوكليوتيدات كما ذكر في موقع آخر ، في حين ان زيادتها تؤدي الى إنتاج نواتج غير متخصصة وتشجع اندماج النيوكليوتيدات غير الصحيح ، وكذلك الحال عند استعمال دوارىء تحوي على مواد خلابة للايونات مثل EDTA لذلك فأفضل إنتاج يكون بتوصية استعمال تراكيز ايونات المغنسيوم يلغي التداخل وسحب الايونات الحرة وخفضها الى مستويات غير ملائمة للتفاعل .

- هناك ترابط وثيق بين محتوى البادىء من C.G ودرجات حرارة الانصهار وحرارة الالتحام ، فمثلا البوادىء بطول 20 قاعدة والحاوية على 50٪ C.G تكون درجات انصهارها بين 56 – 62 ºم وهذه توفر فرصة الالتحام عند تقليلها بـقدر 5 ºم . وعليه فحالة عدم التلاؤم تقلل من كفاءة وتخصص التفاعل ، وذلك لان التخصصية الواطئة يمكن ان تنتج عندما تكون Tm واطئة ، ومن الضروري التأكد من محتوى البادىء من C.G وحرارة الانصهار عند انتخاب أزواج البوادىء من بين مجموعة من البوادىء الممكنة التي تقترحها البرامج الخاصة بالتصميم ، ويوصي البعض بان يكون محتوى البادىء من C.G بحدود 50 –65٪ في حين يوصي البعض الآخر بـ 45 – 55٪ . ولكن كل هذه التوصيات يكون الفيصل بينها النتائج العملية .

- طول البادىء يساهم بشكل كبير في صفة التخصص فالبوادىء بطول 18 –24 قاعدة تميل ان تكون متخصصة اذا استعملت حرارة التحام قريبة من حرارة الانصهار ، ومثل هذه البوادىء تعمل بشكل جيد في تفاعلات الكوثرة العادية وللتواليات التي لا يوجد فيها تغايرات . وكلما زاد طول البادىء زاد التخصص فإضافة قاعدة واحدة يزيد من التخصص أربعة أضعاف (كما ذكر في موضع آخر) وعليه تقل القوالب او الأهداف التي يمكن ان يلتحم معها .

- طول نواتج التفاعل هي الأخرى يمكن ان تتداخل بشكل مؤثر . والعديد من برامج الحاسوب (كما سيأتي ذكره) توفر فرصة لاختيار البوادىء مع طول النواتج التي تنتجها . وطول النواتج له تأثير كبير في كفاءة التضخيم والذي يعتمد بدوره على القوالب

المستعملة . وهذه الصفة تعتمد بدورها على نوعية النماذج وكلك الهدف من التضخيم فمثلا :

- في حالة استعمال النواتج لتحديد التوالي يجب ان تكون القطع بين 150 –1000 قاعدة .

- النماذج السريرية يفضل ان يكون طول النماذج بين 120 –300 قاعدة ، لانها تمثل مواقع خاصة بالجينات الممرضة او المواقع التي يمكن تضم حصول اضطراب فيها ، وبذا يلاحظ تداخل الغرض من التفاعل مع مجريات التفاعل التي يجب ان تحور وفقه .
- في تحضير الجسات يجب ان يكون الناتج بطول كافي بحيث يعطى المعلومات الوافية ، ففي حالة استعمال الجسات لدراسة التغيير الجيني يفضل ان تكون النواتج بين 250 – 750 قاعدة لتكون المعلومات كافية وكذلك لتسهيل عملية فصلها بالترحيل الكهربائي .

وبصورة عامة فان الانتخاب يجب ان يتم لمناطق معروفة عند النهايات `5 و 3` لتوالي محدد ، ويتم انتخاب المناطق الخالية من الفجوات ، وبذلك فان تشابه البوادىء المقترحة سيقل .

الأدوات والأجهزة

خطوات التفاعل وما تحتاجه من تغيير بدرجات الحرارة كانت قديما تتم في حمام مائي ، ولكن في الوقت الحاضر تستعمل مدورات حرارية **Thermal cyclers** متطورة يتم تغيير درجات الحرارة فيها آليا وفي الأوقات المطلوبة اذ يتم برمجة الجهاز وفق الطريقة **Protocol** المرغوب فيها ، وفيما يخص تغيير درجات الحرارة المتدرج في بعض الحالات يتم استعمال أجهزة او مكائن **Gradient PCR machines** . وبهذه الطريقة الآلية يمكن ان تتم الدورة الواحدة بأقل من 5 دقائق . فضلا عن ان الأجهزة الحديثة تحوي على أغطية ملائمة لمنع التبخر في حين كانت هذه العملية تتم قديما باستعمال طبقة من الزيت على أعلى خليط التفاعل او تغطى بطبقة من الشمع .

الفصل الرابع	
فصل نواتج تفاعلات الكوثرة	
آليات الفصل في الهلام	
استعمالات الهلام للفصل	
مواد الهلام	
الأجهزة المستعملة في الترحيل	
ظروف الترحيل الكهربائي	
معاملات السيطرة **Controls**	
إظهار النواتج **Product visualization**	
محددات استعمال الترحيل الكهربائي بالهلام	

فصل نواتج تفاعلات الكوثرة

بعد انتهاء تفاعل الكوثرة تستعمل النواتج اما مباشرة (بعد التأكد منها بتجارب سابقة) من دراسات أخرى مثل تحديد التواليات او الكلونة . او تفصل لإجراء الدراسات عليها او التأكد من وجودها . وعمليات الفصل تتم بالترحيل الكهربائي باستعمال الهلام (Gel) . والهلام يعني الأرضية او الوسط Matrix الذي تتحرك فيه الجزيئات المراد فصلها مثل الجزيئات العملاقة مثل DNA،RNA او البروتينات اعتمادا على مواصفات خاصة من الطول او الحجم بالنسبة للحوامض النووية او الشحنات بالنسبة للبروتينات او بالاعتماد على صفات فيزيائية أخرى بعد تسليط مجال كهربائي لتحريك الجزيئات خلال أرضية الهلام ضمن ظاهرة النخل Sieving وتحدد هذه بحجم الثقوب التي يمكن تدخلها الجزيئات العملاقة .

آليات الفصل في الهلام

تطبق عمليات الفصل في تفاعلات الكوثرة العادية على النواتج اي End-point products والترحيل الكهربائي Electrophoresis يتضمن مفهوم تسليط القوة الدافعة Electromotive force (EMF) التي تستعمل لتحريك الجزيئات خلال أرضية الهلام . وتركيبة الهلام وحجم الشبكات المتكونة Crossed linked polymer Networks او طبيعة تركيب أخرى تحدد الثقوب وحجمها وبالتالي تحدد الوزن الخاص للجزيئات التي سيمررها ونوعيتها ، اي يمكن تعريفه على انه هجرة الجزيئات المشحونة وإجبارها على الحركة تحت تأثير مجال كهربائي الذي يزود على طرفي الهلام بالربط الى أقطاب كهربائية للتزويد بالقوة الدافعة للحركة .
وتختلف الآليات في الفصل اعتمادا على الجزيئات فالبعض يحمل مجاميع متأينة تحدد السرعة التي ستتحرك بها الجزيئات في وسط الهلام . ومن الجدير بالذكر ان جزيئات DNAتتصرف على انها قضبان طويلة Long rods لذلك تكون حركتها في الهلام معتمدة على حجمها . اما الجزيئات الحلقية فتكون حركتها معتمدة على نصف قطر التدوير Radius of gyration ، فالجزيئات مثل البلازميدات يمكن ان تظهر عدة حزم والحركة او الهجرة تكون معتمدة فيما اذا كانت الجزيئة في حالة ارتخاء Relaxed او ملتفة Super coil . اما الجزيئات ذات الأشرطة المفردة من DNA او RNA والتي تميل للانطواء وتكوين جزيئات معقدة الأشكال فانها تهاجر خلال الهلام بنمط معقد

معتمدا على التركيب الثلاثي . لذلك فان من العوامل التي تكسر الأواصر الهيدروجينية مثل NaOH و Formamide تستعمل لمسخ الحوامض النووية وتجعلها تحرك كقضبان طويلة . والهلام يستعمل لفصل :

• **البروتينات** وتتحرك هذه الجزيئات وفق الشحنة التي تحملها لان ثقوب بعض أنواع الهلام مثل الاكاروز تكون كبيرة فلا تساعد في نخل وفصل البروتينات . ويمكن ان تستغل ظروف الهلام مثل استعمال ظروف المسخ عند وجود SDS التي تفك فيها طويات البروتينات وتمسخه ، فضلا عن استعمال إمكانيات أخرى .

• **جزيئات DNA**

وهذه تكون مشحونة بشحنة سالبة وتكون نسبة الشحنة / الكتلة ثابتة لذلك تتحرك باتجاه القطب الموجب وفقا للحجم . فبعد وضع النموذج في حفرة الهلام سوف تتحرك الجزيئات الصغيرة بسرعة اكبر من الجزيئات الكبيرة ، وكل مسار Lane سوف تظهر فيه المواد الموجودة في النموذج على شكل حزم Bands والتي تمثل احد المكونات وعند عدم الفصل التام يمكن ان تظهر حزم متداخلة بشكل مسحة Smear التي تشير الى وجود عدة مكونات غير مفصولة عن بعضها . والحزم التي لها المواقع نفسها في المسارات المتوازية والتي تعرضت لظروف الفصل نفسها تشير الى ان لها الحجم نفسه الذي يقارن بسلم الواسمات Marker ladder ذات الأوزان المعروفة . وهذا يعني ان معدل الهجرة او الحركة يعتمد على طول او حجم القطعة ومن نمط الحزم او ظهورها يمكن معرفة مدى نجاح تفاعل الكوثرة .

ومن الجدير بالذكر ان اغلب أنواع الهلام المستعملة لها صفة مضادة لنقل الحرارة بطريقة الحمل Anticonvective ، لذلك يحبط الحمل الحراري الناتج من استعمال المجال الكهربائي ويكون ملائما لعملية النخل ، واغلبها قادرة على الحفاظ على ما تم فصله لمدة معينة وبالتالي يمكن استعمالها في الدراسات اللاحقة .

• **جزيئات RNA**

يمكن ان ترحل في الهلام لأغراض مختلفة مثل الكشف عن تلوث نماذج بجزيئات RNA أو تفككه و RNA في النماذج المشتقة من الخلايا حقيقية النواة تظهر حزم واضحة للجزيئات

18S rRNA ، 28S rRNA اما المفكك فيظهر حزم اقل وضوحا وتظهر عادة بشكل مسحة وبشدة اقل .

استعمالات الهلام للفصل

تستعمل أنواع الهلام لأغراض عدة وذلك لسهولة التعامل معه . فهو يستعمل في فصل الجزيئات النانوية Nanoparticles ، وكذلك يستعمل كأحد التقنيات الحيوية المهمة لدراسة أساسيات الحياة ، وتشخيص الأمراض وتطوير علاجات جديدة لها ، وكذلك في التعامل الوراثي للدراسة مثل دراسة نمط المواد الوراثية بعد تقطيعها بإنزيمات القطع للتعرف على نمط الحزم ، ولذا يمكن استعمالها في فصل وتنقية قطعة معينة تحوي على الجين المطلوب التي يمكن ان تسترد من الهلام وهي بحالة طبيعية . كما يستعمل الهلام في التعرف على الاختلافات الوراثية والعلاقات التطورية بين الأنواع . وكذلك يمكن ان يستعمل في فصل جزيئات RNA .

واهم استعمالات الهلام هي فصل منتجات تفاعلات الكوثرة التي قد تقطع بالإنزيمات القاطعة لتستعمل في الكلونة او تفصل لاستعمالها في دراسات أخرى بعد استخلاص DNA من الهلام. وقد يكون فصل الحوامض النووية تحت ظروف المسخ مثل استعمال هلام قاعدي التفاعل والتي تكون ملائمة لتحليل الأشرطة المفردة ssDNA ولكن مثل هذه لظروف غير ملائمة للـ RNA لانه يتحلل بالظروف القاعدية .

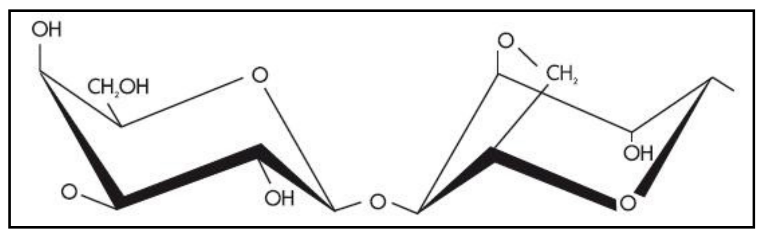
مواد الهلام

هناك عدد من المواد تصلح لتكوين الهلام لتكون أرضية صلبة حاوية على الثقوب ومنها النشا بتركيز 5 –10٪ ولكن فائدته قليلة .

ولكن كل من الاكاروز Agarose وهلام متعدد الاكريلاميد Polyacrylamide هي الأكثر استعمالا في فصل منتجات تفاعل الكوثرة ولكن ببعض التقييدات وهي التي سيتم تناولها ببعض التفصيل .

هلام الاكاروز Agarose

الاكاروز متعدد للـ Galactan يتكون من ارتباط Agarobioses بارتباطات 3 –1 و 4 –1 كما موضح في الشكل 12 .



شكل 12 : التركيب الكيماوي للاكاروز

ويكون بشكل سلاسل طويلة غير متفرعة وغير مشحونة من الكربوهيدرات وبدون اتصالات عرضية Cross links ، هذه التركيبة تؤدي الى تكوين ثقوب كبيرة ملائمة لفصل الجزيئات الكبيرة او المعقدات الجزيئية الكبيرة .

مواصفات الاكاروز

تركيبة الاكاروز تعطيه القابلية لتكوين الهلام الذي يكون مقاوما حتى عند التراكيز الواطئة . يمتلك هلام الاكاروز تركيب بشكل شبكة مفتوحة يمكن التحكم بها بواسطة تغيير التركيز والشبكة او التركيب الشبكي Macroreticule يتكون بواسطة الأواصر الهيدروجينية التي تجعل الهلام متلائما مع درجات الحرارة اذ يكون Thermoreversible ، فهو ينصهر بالتسخين عند درجة حرارة 80 – 95 ºم ويكون هلام بدرجات حرارية 32– 45 ºم ، ويمكن ان تحور درجات الحرارة لأغراض خاصة . والاكاروز مادة متعادلة وغير سامة لذلك يمكن التعامل معها بحرية .

الاكاروز سهل الصب والتداول مقارنة بالمواد الأخرى وبما ان عملية تكوين الهلام هي عملية فيزياوية وليست كيماوية لذلك يمكن استخلاص المواد منه بسهولة ، ويمكن بعد انتهاء التجارب خزن الهلام في أوعية بلاستيكية في الثلاجة . وبالرغم من هذه المواصفات فان الاكاروز يمكن ان يتأثر بطبيعة المواد التي يذاب فيها ، فالمواد التي تدمر الأواصر الهيدروجينية (كما في بعض أنواع الدواريء) تؤدي الى تقليل درجة الانصهار وقوة الهلام ويمكن ان تثبط عملية تكوين الهلام .

استعمالات هلام الاكاروز

لهلام الاكاروز استعمالات كثيرة في الدراسات البايولوجية والكيمياء الحيوية ودراسة تركيب الخلايا وفي مجال دراسة الأحياء المجهرية . وأكثر الاستعمالات هو فصل الجزيئات الناتجة من تفاعلات الكوثرة التي تهيأ لإجراء الكلونه او تحديد التوالي اوتصنيع المجسات .

أنواع الاكاروز

تختلف أنواع الاكاروز المنتجة والمتوفرة تجاريا بعدد من الصفات مثل نسبة الرطوبة ونسبة الرماد ، ومحتواها من الكبريتات وصفة الصفاء ، وقوة الهلام عند تراكيز مختلفة ، ودرجة الحرارة التي تحول سائل الاكاروز الى الحالة الصلبة (Gelling temp) وكذلك درجة حرارة الانصهار ، ودرجة وضوح حزم DNA الظاهر فيها ، وخلفية الهلام وغيرها من الصفات .

وتنتج الشركات المعنية الأنواع المختلفة منها ما هو ذات انصهار واطئ (LM agarose) Low melting gel او ما يسمى Low melt sieve agarose ومثل هذا له درجة انصهار واطئة وسعة عالية من دقة تفاصيل الحزم Resolution للقطع الصغيرة (الأقل من 1000 قاعدة) كما في القطع الناتجة من تفاعلات الكوثرة التي تصل بين 200 –800 قاعدة ويكون سهل الهضم بإنزيم Agarase ، ويمكن استخلاص قطع DNA منه للاستعمالات الأخرى ولا يرتبط بجزيئات DNA . وتصل قوة الوضوح به الى حوالي 50 قاعدة والبعض منه تصل قابلية فصله الى 20 قاعدة . كما توجد أنواع أخرى تستعمل لفصل القطع الصغيرة جدا كما في MetaPhor agarose . واغلب أنواع الهلام ذات درجات الحرارة الواطئة يتم استعمالها بدرجات حرارية واطئة اي استعمال دواريء باردة وعدم استعمال فولتية عالية خشية ارتفاع الحرارة التي تؤدي الى تسخين الداريء ومن ثم انصهار الهلام .

وتوجد انواع كثيرة تختلف في قابلية الفصل اعتمادا على التركيز والذي يتناسب عكسيا مع حجم القطع الممكن فصلها وكذلك على نوع الداريء المستعمل في عملية الترحيل الكهربائي . وتنتج الشركات المختصة أنواع كثيرة وبمواصفات محددة .

تراكيز الاكاروز المستعملة

تتناسب التراكيز المستعملة بشكل عكسي مع حجم قطع DNA الممكن فصلها . وبصورة عامة فان الاكاروز العادي يستعمل لفصل القطع الأكبر من 200 قاعدة ، وعندما يراد فصل قطع اصغر من ذلك وبوضوح عال يستعمل هلام الاكريلامايد . وتراكيز الاكاروز تحدد حجم الثقوب في الهلام فضلا عن مشاركة نوع الهلام في تحديد هذه الصفة ، لذلك فالتركيز هو الذي يحدد مواقع الحزم على الهلام ، ويكون التركيز المستعمل معتمدا على حجم القطع المتوقع الحصول عليها من نواتج الكوثرة .

التراكيز العامة من الاكاروز تمتد من حوالي 0.6٪ الى 3٪ وهي قيم تقريبية وعند عدم معرفة حجم القطعة يفضل البدء بتركيز 0.7٪ ثم يزاد التركيز ان لم تكن النتائج مقبولة ، وأكثر التراكيز استعمالا 1٪ الملائم لعدد كبير من التطبيقات ، والتراكيز الواطئة تفصل القطع الكبيرة ولكن يكون من الصعوبة التعامل معها . اما التراكيز العالية تكون ملائمة لفصل القطع الصغيرة ، وعملية الترحيل عند استعمال تراكيز عالية تكون بطيئة وتحتاج وقت طويل قد يصل الى الأيام . وبعض الأحيان تكون هناك حاجة الى طريقة ترحيل خاصة مثل استعمال Pulsed field gel electrophoresis (PFE) او طريقة الترحيل العكسي Field inversion gel electrophoresis فضلا عن ان الهلام المحضر بتراكيز عالية يكون هشا ولا يتصلب بشكل متجانس مما يؤثر في نتائج الفصل .

تحضير هلام الاكاروز

الأنواع المختلفة من الاكاروز تختلف في تصرفاتها ولا توجد طريقة عامة لتحضيرها من حيث التسخين والصهر ، ولكن الأنواع العامة المستعملة تذوب في دواريء الترحيل او في الماء ويستعمل وعاء كبير نسبيا ملائم لأفران Microwave ويضاف الاكاروز الى هذه السوائل الباردة مع التحريك لتجنب التكتل ويترك النموذج لمدة دقائق لترك الاكاروز للتشبع بالماء Hydration قبل عمليات التسخين والإذابة ، ومثل هذا التشبع بدرجات حرارة واطئة (اي استعمال ماء بارد) ستسمح بالانصهار السريع والسهل وعدم تكون الرغوة .

محلول الاكاروز يغلي بسهولة بحوالي دقيقة واحدة لذلك يسخن لمدة 45 ثانية (بالنسبة لحجم 100 مللتر) ثم يخلط ويجب الحذر من حدوث حالة التسخين المفرط Overheating ويمكن استعمال أفران Microwave لهذه المهامة او مصباح بنزن Bunsen burner ولكن مع المراقبة . وتتم عملية الصهر الاكاروز بالتسخين المتقطع الى ان يذوب وينصهر تماما .

بعد انتهاء عملية ذوبان الاكاروز يترك ليبرد الى حوالي60 ºم ثم يصب في وعاء الترحيل بهدوء . ثم يترك ليبرد ويتصلب بالتدريج لان التبريد السريع يؤدي الى تكوين هلام غير متجانس وبالتالي يؤدي الى تشوه Distortion الحزم بعد الترحيل . اما عند استعمال الأنواع واطئة الانصهار فيحتاج الهلام ان يترك لمدة حوالي 30 دقيقة ليبرد أكثر من الهلام العادي او يترك لليوم الثاني بدرجة حرارة 4–8 ºم للسماح بعملية تكوين الهلام بشكل كامل .

هلام متعدد الاكريلاميد Polyacrylamide gel

يمثل النوع الثاني من أنواع الهلام المستعملة في فصل نواتج الكوثرة وأساسا يستعمل لفصل البروتينات بحجم 5 –2000 كيلو دالتون وكذلك في الدراسات المناعية وتحليل نظائر البروتينات Isoforms نظرا لتجانس الثقوب الموجودة فيه والتي يسيطر عليها بالتلاعب بتركيز المادة الأساسية Bis-acrylamide و Acrylamide والمواد الأخرى المشاركة في تكوين الهلام . والمادة الأولية فيه تكون سامة للأعصاب سواء كانت بشكل مسحوق او سائل لذلك يتم تجنب استعماله عند إمكانية الاستغناء .

يستعمل الهلام في بعض الطرق مثل تحديد التواليات باستعمال طريقة Maxam and Gilbert او Sanger لفصل قطع DNA المراد تحديد تواليتها ، لان هذه الطريقة تكون حساسة جدا في الفصل خاصة للقطع الصغيرة من DNA ، ولو انه في الوقت الحاضر يستعمل الاكاروز لهذه الأغراض ما عدا عندما تكون قطع DNA صغيرة جدا .

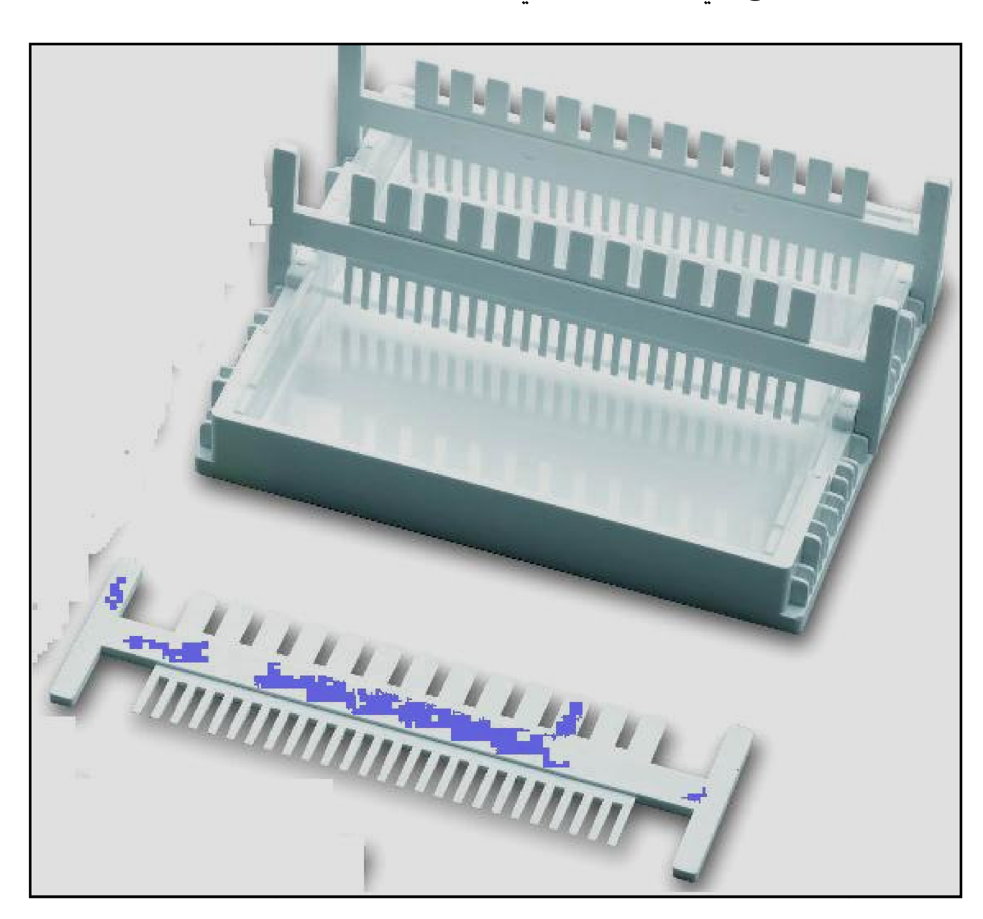
يستعمل الهلام بتراكيز 6 ٪ ، 8 ٪ ، 10٪ ، 12٪ ، 15٪ ، لتكوين الهلام Slab بشكل متجانس ولزيادة وضوح الحزم فيه تستعمل التراكيز المتدرجة بدا من 5٪ الى 15٪ (Gradient gel) . ويستعمل الهلام اللازم لوضع النماذج Stacking gel بتركيز 5٪ وفيه يتم إدخال المشط Comb لعمل الثقوب لوضع النماذج . والنسبة المئوية للتركيز يتم اختيارها اعتمادا على حجم البروتين المراد فصله ، فالأوزان الصغيرة تستعمل لها نسب مئوية عالية من الهلام ، كما يمكن زيادة المعلومات التي يتم الحصول عليها من عملية الترحيل بالتلاعب بالدواريء المستعملة .

الأجهزة المستعملة في الترحيل

تستعمل أوعية او خزانات مختلفة لصب الهلام وإجراء عملية الترحيل الكهربائي وأفضلها استعمال الصغيرة منها Mini gels التي تكون بأبعاد 8× 10 سم التي تكون

اقتصادية وملائمة للحجوم التي يتعامل معها تفاعل الكوثرة . كما انها كافية لإعطاء صور واضحة ، وهذه تحتاج الى حوالي 30 – 50 مللتر من الهلام اما الأوعية الكبيرة التي تستعمل لتطبيقات خاصة مثل إجراء Southern blot او Northern blot فتحتاج الى حوالي 250 مللتر من الهلام .

وبعد صب الهلام في الأوعية الخاصة به ، يوضع المشط Comb بشكل عمودي لغرض تكوين الحفر لوضع النماذج ويغطى الوعاء ويترك ليبرد ويتصلب الهلام ويحدد حجم الحفر اعتمادا على حجم نموذج DNA الذي سيستعمل وكذلك عدد النماذج . بعض الأمشاط تعطي ثقوب تستوعب 10 مايكرولتر من النموذج وهذه غير ملائمة للنماذج المستعملة عموما اذ يتم وضع 20 مايكرولتر بعد إضافة داريء التحميل لها والذي قد يصل حجمه الى 5 مايكرولتر . اما عدد الحفر فيفضل ان تكون بعدد النماذج مضافا اليها 1–2 لوضع الواسمات الوزنية ، مع الأخذ بنظر الاعتبار ترك بعض المسارات لمعاملات السيطرة . والجهاز موضح في الشكل الآتي (شكل 13) .



شكل 13 : جهاز الترحيل الكهربائي

ملاحظات عامة عند تحضير الهلام واستعمالاته

هناك بعض الملاحظات العامة التي يجب الالتفات اليها لغرض إنجاح عملية تحضير الهلام ومنها :

- تفادي تغير حجم محلول الهلام نتيجة للتسخين ولذلك يغطى وعاء التحضير او يعدل الحجم بالماء المقطر الحار للحفاظ على الحجم الأصلي .
- تغطية الهلام بعد صبه وتركه ليبرد لتفادي التبخر ، ويترك ليتصلب تماما وبالتدريج .
- بعد اكتمال تصلب الهلام التدريجي (وإلا سيعطي حزم منتشرة وغير واضحة او يعطى مسحة من DNA) يغمر تماما بالداريء الذي سيستعمل في الترحيل (مثل استعمال TBE) لعمق 2– 5 ملم والتأكد من ان الهلام مغطى تماما ويمكن ان يخزن في الثلاجة لعدة أيام .
- هلام الاكاروز يمكن ان يعاد صهره وصبه عدة مرات دون التأثير في صفاته ، لذلك يمكن تحضير كميات كبيرة منه توزع على وجبات صغيرة وتستعمل عند الحاجة .
- يجب استعمال الداريء نفسه الذي استعمل في تحضير الهلام في عملية الترحيل.
- يضاف النموذج بعد خلطه مع داريء التحميل الذي يحوي على الكليسرول او السكروز او Ficoll لجعل الكثافة عالية ويمكن من غطس النموذج والاستقرار في الحفرة .
- عند استعمال الهلام يفضل عدم استعمال المسارات Lanes الجانبية اي الخارجية لان النماذج فيها تكون عرضة للحركة بشكل منحرف ، لذلك يفضل استعمال المسارات الوسطية .

ظروف الترحيل الكهربائي

تشمل مدة الترحيل وحرارة الترحيل وكذلك الفولتية (فرق الجهد) والتيار المستعملة لتوليد المجال لكهربائي . ويمكن ان تتأثر ظروف الترحيل بحجم قطع DNA وتركيزها لذلك يفضل في البداية التعرف على مثل هذه المعلومات ويفضل ترحيل قطع سليمة (Uncut DNA) بتراكيز مختلفة على هلام واحد مع قطع معروفة التركيز (المقاسة باستعمال الطول موجي A_{260}) ثم مقارنة الكثافة بالنظر بين القطع غير معروفة التركيز او الوزن مع القطع المعروفة مثل استعمال واسمات Hind III λ او اي واسمات أخرى .

- **المجال الكهربائي** : بعد تحضير الهلام وتسليط المجال الكهربائي يجب بداية التأكد من سريان التيار الكهربائي وذلك بفحص مزود القدرة الكهربائية ، ولكن الأفضل ملاحظة ظهور الفقاعات الغازية عند الأقطاب والتي يجب ان تؤخذ بنظر الاعتبار خاصة عند

استعمال الماء بدلا من داريء الترحيل ، وعند ملاحظة عدم سريان التيار الكهربائي يجب التأكد من عملية التوصيل او اتخاذ اي إجراءات أخرى .

• **الجهد الكهربائي** : يعتمد على الظروف مثل تركيز الاكاروز ، داريء الترحيل ، حجم القطع المرحلة .
والفولتية المستعملة عامة تكون بحدود 4 –8 فولت /سم من طول الهلام ويجب ان تكون ثابتة . اما التيار الذي تنتجه فيعتمد على نوعية المواد التي يسري فيها التيار وقيم المقاومة لها . وقيم الفولتية قد لا تكون مهمة جدا عندما يراد التعرف فيما اذا كانت النواتج موجودة او لا .
ومن الضروري معرفة ان الفولتية العالية تؤدي الى رفع درجة الحرارة وانصهار الهلام ، وان كانت تسرع من حركة القطع الكبيرة بأسرع من تسريعها للقطع الصغيرة وذلك لان الشحنات تتوزع على الجزيئة بالتساوي لذا فالقطع الكبيرة لها شحنات أكثر . وعلى العموم عندما تكون الفولتية عالية وتركيز الهلام واطئ يحصل ترحيل سريع واختصار في الوقت ولكن على حساب وضوح الحزم في الهلام . اما الفولتية الواطئة فانها تطيل من وقت الترحيل (لمدة يوم تقريبا) ويمكن ان تؤدي الى انتشار نواتج التضخيم من الهلام .
وفي جميع الأحوال يكون نموذج الواسمات الوزنية Ladder هو الدليل الواضح على ملائمة الفولتية ، والوقت اللازم للترحيل ويتم إيقاف عملية الترحيل اعتمادا على المسافة التي تتحركها الصبغات الموجودة مع النموذج في داريء الترحيل مثلا عند استعمال Bromophenol blue يكون من الأفضل إيقاف الترحيل بعد ان تكون الصبغة قد وصلت الى ثلثي طول الهلام ، وفي العموم الأوقات المسجلة تتراوح بين 30 –40 دقيقة وهذه بدورها تعتمد على الظروف الأخرى المطبقة .
وتحسب الفولتية بعد قياس المسافة بين قطبي جهاز القدرة المزودة بالسنتيمتر :

الفولتية الملائمة = $X \times Y$

X تمثل طول الهلام بالسم
Y المدى المستعمل من الفولتية /سم
ولتطبيق الفولتية المستعملة بعض الاستثناءات فيمكن استعمال فولتية عالية للتسريع في عملية الترحيل ولكن يجب اخذ الاحتياطات مثل إجراء العملية في جو بارد .
ويمكن تطبيق الفولتية بأكثر من طور فالبعض يستعمل 2 فولت /سم في الدقائق العشر الأولى ثم بعد ذلك ترفع الفولتية للحدود المعروفة مثل 5 فولت /سم وهذه تعطي وضوح أفضل للحزم الناتجة . اما في حالة الرغبة في إطالة مدة الترحيل فيمكن

استعمال 0.2 –0.5 فولت /سم وعندها يمكن ان يترك الهلام لليوم التالي ولكن هذه تجرى عند الضرورة لان خفض الفولتية يؤثر في وضوح الحزم .

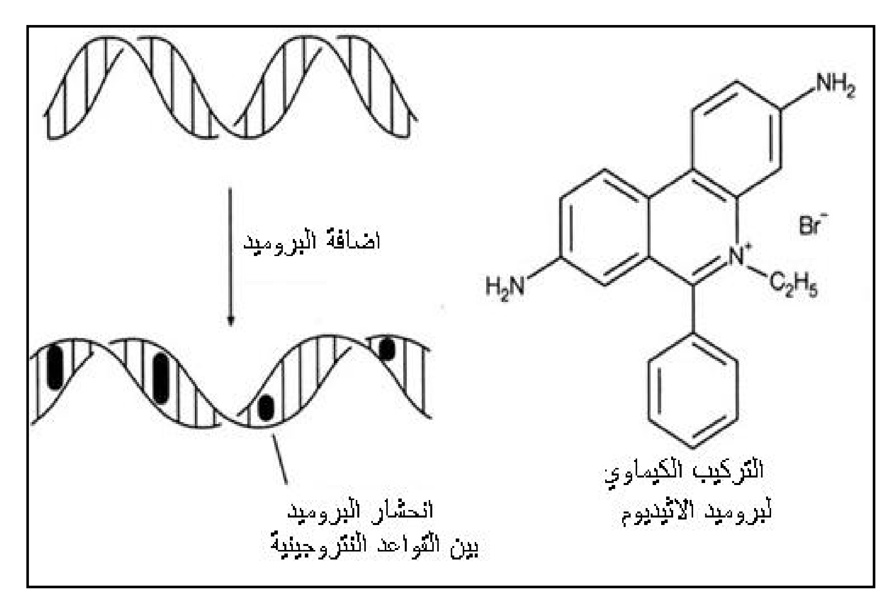
معاملات السيطرة Controls

لابد من استعمال بعض معاملات السيطرة عند ترحيل النماذج في الهلام ومن هذه السيطرات

- السيطرة السالبة وتستعمل لغرض الكشف عن النتائج الموجبة الكاذبة الناجمة عن التلوث . وتتكون من كل مكونات التفاعل مثل البواديء والدواريء ما عدا DNA القالب المراد تضخيمه .
- السيطرة الموجبة وتستعمل للتأكد من ان الدواريء وغيرها من مكونات خليط التفاعل تعمل بشكل جيد وعند الحد الأمثل ، وتزود بعض الشركات بنماذج للسيطرة الموجبة للتأكد من مكونات العدد التي تبيعها .
- السلم المعياري او الواسمات الوزنية Ladder وهو خليط من قطع معروفة الحجم تستعمل لمقارنة الحزم ، وقد تكون هذه مكونة من بلازميدات او عاثيات او اي قطع أخرى معروفة الحجم والتوالي وتهضم بالإنزيمات القاطعة لإعطاء سلسلة من القطع بأحجام مختلفة ، او تكون محضرة صناعيا . ويستعمل السلم المعياري لغرض أمثُلة ظروف أخرى مثل الفولتية المستعملة والوقت ودرجات الحرارة وغيرها من الظروف .
- سيطرات أخرى يمكن ان تستعمل لمعرفة مدى جودة أداء مخاليط الدواريء مثل Premix او Master mix .

إظهار النواتج Product visualization

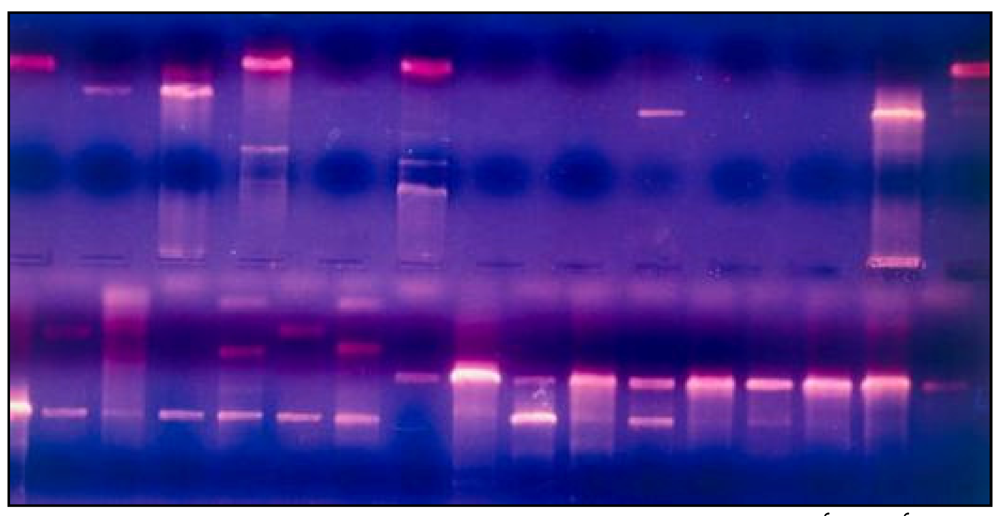
بعد انتهاء عملية الترحيل يتم إظهار النواتج باستعمال صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium bromide او اي صبغة أخرى او طريقة أخرى وتركيب الصبغة موضح في الآتي :



شكل 14 : تركيب جزيئة بروميد الاثيديوم

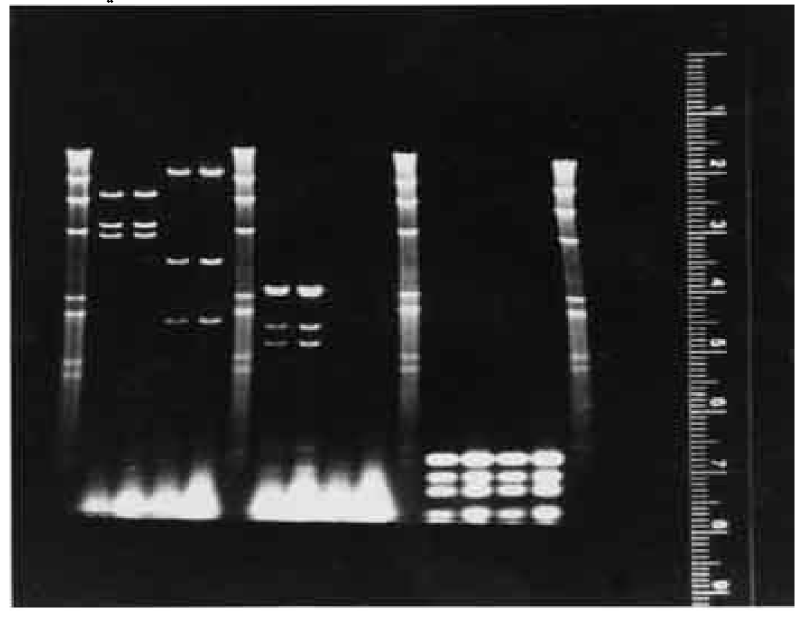
وفي أكثر تطبيقات تفاعلات الكوثرة يستعمل البروميد بتراكيز مختلفة والتي تتراوح بين 0.1 -0.5 مايكروغرام /مللتر . واستعماله يعتمد على الغرض من عملية الترحيل . والبروميد مادة سامة ومطفرة لذلك يمكن تلافي الأذى باستعمالها بشكل حبوب Tablets بدلا من المسحوق ، ويحضر بشكل محلول خزين Stock solution يخزن في الظلام بعد تعليمه بانه محلول خطر .

يتم إظهار الصور تحت الضوء فوق البنفسجي حيث يعطي البروميد المرتبط بقوة بقواعد DNA (خاصة في الأخدود الكبير لجزيئة DNA) تألقا برتقاليا كما في الصورة التالية (شكل 14 \ أ) .



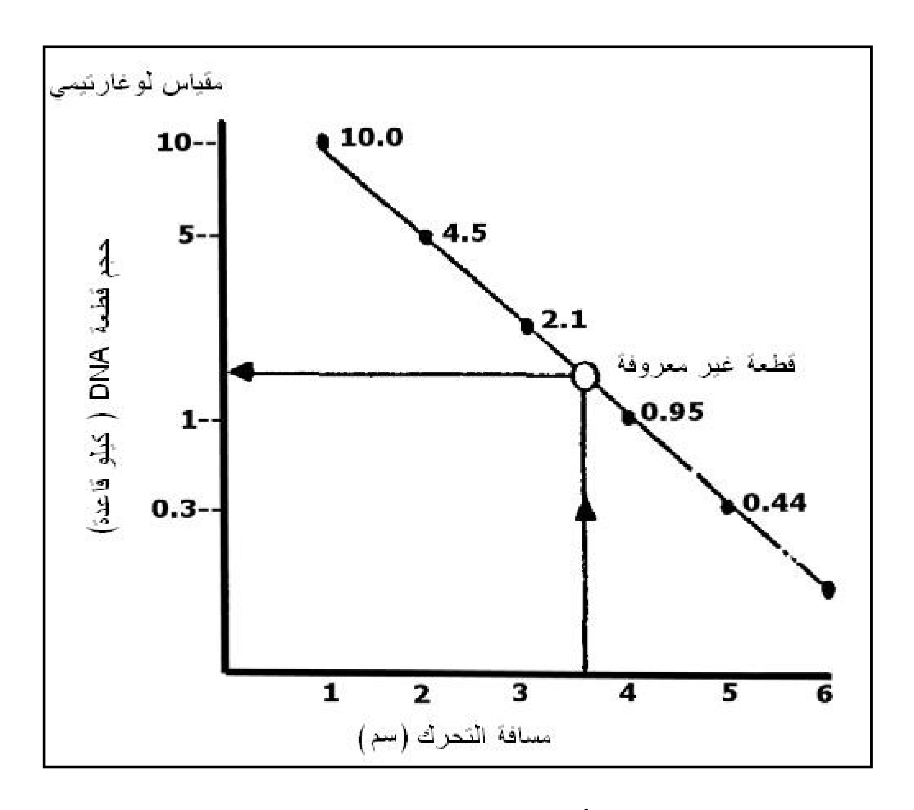
شكل 14\ أ : التألق البرتقالي لبروميد الاثيديوم تحت الضوء فوق البنفسجي

وتصور بكاميرات خاصة على مسند فيه مسطرة كما موضح في الشكل 14 \ب .



شكل 14\ ب : قياس المسافة التي تقطعها حزم DNA

وبمقارنة الحجوم على منحنيات تعيير يمثل المحور السيني المسافة التي تتحركها القطعة (سم) والمحور الصادي يمثل حجم القطع سواء بالمقياس اللوغارتمي او باستعمال الأوزان الحقيقية باستعمال أوراق رسم Semi log . ويوضح الشكل (15) احد هذه المنحنيات .



شكل 15 : منحنى التعيير لأوزان لجزيئات DNA والمسافات التي تتحركها

او بالمقارنة مع الواسمات الوزنية .
البروميد يمكن ان يضاف الى محلول تحضير الهلام قبل عملية الصب مباشرة وذلك لان إضافة البروميد الى الهلام الساخن يؤدي الى تصاعد أبخرة البروميد السامة وعندما يراد استعمال النواتج في الكلونة فيتم تصبيغ الهلام بعد الترحيل لان البروميد يؤدي الى ثلم جزيئات DNA .
وعندما يراد التصبيغ بعد الترحيل ينقع الهلام في محلول البروميد لمدة 10–15 دقيقة ، ثم يزال الفائض من الصبغة بنقع الهلام في داريء بتركيز 0.5X ، واذا كانت الحزم باهتة فيعاد الهلام الى محلول التصبيغ وهذا يكون بعد المقارنة والتأكد من الواسمات الوزنية المرافقة (Ladder) .

محددات استعمال الترحيل الكهربائي بالهلام

للترحيل الهلامي مزايا جيدة ولكن على الجانب الثاني هناك بعض المساوئ او الجوانب السلبية ومنها :

- عند مرور تيار كهربائي عالي في الهلام لغرض التسريع فانه يؤدي الى تسخين داريء الترحيل وربما انصهار الهلام . والترحيل يتم في المحاليل الدائرة لغرض التقليل من التغير

في الرقم الهيدروجيني التي يمكن ان تحصل نتيجة مرور التيار الكهربائي وهذه تكون مهمة جدا لان شحنات الحوامض النووية تعتمد على الرقم الهيدروجيني ، ولكن عند استعمال الترحيل لمدة طويلة يمكن ان تستنزف السعة الدارئة لمحلول .

- بعض المواد الوراثية لا تتحرك بشكل متناسق في الهلام نظرا لأسباب تتعلق بالتركيب الجزيئي لها او تحويرها او غيرها من الأسباب .
- عملية الترحيل تأخذ وقتا ليس بالقصير .
- الطريقة تعتمد على التمييز بين الأحجام (الأوزان) لذلك فالنواتج المختلفة ذات الحجوم
المتساوية لا يمكن التمييز بينها .
- الفصل والتحليل يمكن ان يختلف من نموذج لآخر .
- حساسية الترحيل تكون واطئة .
- النتائج تكون عادة نوعية او شبه كمية .
- التحليل لا يمكن ان يحول الى شكل الي .
- تحتاج المواد المفصولة الى بعض الإجراءات لغرض استعمالها في دراسات أخرى .
- تعريض DNA للأشعة فوق البنفسجية يؤدي الى تدمير DNA والذي يؤثر في العمليات اللاحقة مثل الربط الى نواقل الكلونة وفي مثل هذه الحالات يتم تجنب استعمال UV واستعمال مصادر الضوء الأزرق Blue light excitation source مثل Xcita Blue screen اي تحويله الى اللون الأزرق او غيرها من الوسائل ، وعند التحول الى اللون الأزرق تحتاج العملية الى استعمال صبغات SYBR green او صبغات Gel green التي ترتبط الى الأخدود الصغير وذلك لان الضوء الأزرق أكثر أمانا من الضوء البنفسجي وحتى لا يحتاج الى حماية العيون ويمر بسهولة من صفائح الزجاج او البلاستك الشفافة ، ومن ثم يسهل دراستها بأي من برامج تحليل الصور مثل ImageJ او غيرها .
- نظرا لكون البروميد مادة خطرة فالتشريعات الخاصة بكل بلد قد تجعل عملية التخلص منه مكلفة . كما ان إظهاره لا يتم الا باستعمال الأشعة فوق البنفسجية .

تنظيف النواتج لإجراء دراسات أخرى

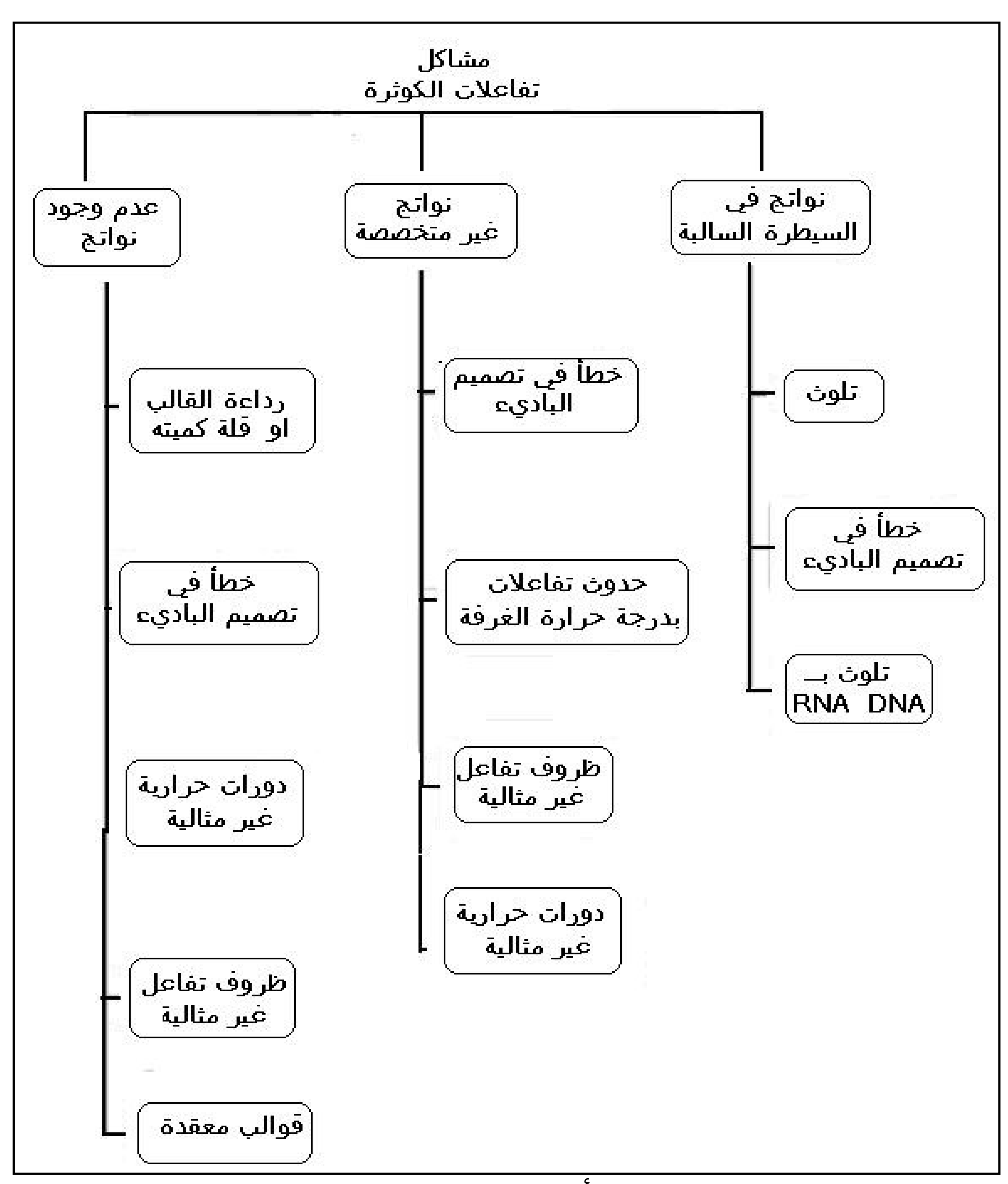
اذا كانت عملية الكوثرة تتم بظروف مضبوطة ومثالية فان كل من البادىء و dNTPs تكون قد استهلكت وفقدت ، ولكن القليل منها يمكن ان يبقى ويتداخل مع عمليات ودراسات ما بعد الكوثرة والفصل ، وكذلك يكون من الضروري الحصول على كميات كبيرة في عملية الكلونة وهذه تحتاج وجود حزم كبيرة واضحة على الهلام ، وفي حالة وجود أكثر من حزمة لابد من إعادة تفاعل الكوثرة .

ففي الأحوال المثالية لا تحتاج نواتج التضخيم الى تنظيف . وعمليات التنظيف بعد التضخيم تجري على الهلام ، وعند الحاجة فيتم ترحيل نواتج الترحيل الأول بقطع الحزمة المطلوبة واستخلاص DNA من الحزمة المقطوعة بطرق الاستخلاص Gel extraction او Electro Elution او باستعمال الدواريء وأعمدة الفصل (التي سيأتي ذكرها لاحقا) ثم يتم ترحيل الناتج على هلام ذات درجة انصهار واطئة . وفي الوقت الحاضر تجهز الشركات عدد خاصة لتنظيف نواتج التضخيم . وبعد التنظيف لابد من التأكد من وجود كميات كافية باستعمال الوسائل المختلفة أجهزة مثل Nano drop او استعمال مطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV spectra photometer) Nanophotometer او غيرها من الوسائل .

الفصل الخامس	
المشاكل واستعمالات تفاعلات الكوثرة	
ترشيد عمليات أمثلة تفاعل الكوثرة	
أنواع المشاكل	
أولا: عدم ظهور نواتج بعد التفاعل **No bands**	
ثانيا : الحصول على حاصل قليل **Low yield**	
ثالثا : ظهور حزم غير مرغوب فيها	
رابعا : ظهور نمط غير مثالي للحزم	
خامسا : ظهور نواتج متعددة	
سادسا : تكوين مزدوجات البوادىء **(PD) Primer dimers**	
سابعا : ظهور حزم باهتة **Faint bands**	
ثامنا : مشاكل أخرى	
مشاكل ما بعد الكوثرة	
استعمالات تفاعل الكوثرة	
محددات استعمال تفاعل الكوثرة	
الأنواع الخاصة من تفاعلات الكوثرة	
الكوثرة الآنية **Real-Time PCR**	
تفاعل الكوثرة الرقمي **Digital PCR**	

المشاكل واستعمالات تفاعلات الكوثرة

بالرغم من ان الكيمياء الحيوية هي علم مضبوط الا انها حساسة للعديد من المؤثرات . وبالرغم من اخذ كل الاحتياطات الممكنة من نقاوة مواد واستعمال ظروف مثالية الا ان تفاعل الكوثرة يمكن ان يفشل نتيجة لبعض المشاكل ، وتتخذ المشاكل أنماطا عدة كما موضح في الشكل 16



شكل 16 : مخطط لأنواع المشاكل في تفاعلات الكوثرة

وابرز المشاكل هو عدم ظهور نواتج تضخيم ، او ان الحزم بأحجام غير صحيحة مثل يتوقع ان جين بطول 1800 قاعدة تظهر بدلا عنه قطعة بطول 500 قاعدة او وجود حزم إضافية ، او عدم انسجام النتائج وغيرها .
فبداية وقبل كل الإجراءات يجب التأكد من وجود حزم DNA على الهلام للتأكد من ان العملية تسير بشكل صحيح . وبعد ظهور المشاكل فأن التصرف العام هو البدء بتغيير المؤشرات الكيماوية والفيزياوية التي يمكن ان تؤثر في ارتباط البادىء او إطالته .

ترشيد عمليات أمثلة تفاعل الكوثرة

ان تجربة تغيير كل العوامل تكون عملية مجهدة وتتعقد أكثر عندما يكون هناك تداخل بين العوامل المؤثرة ، لذلك يتم استعمال طريقة Taguchi (1980) وفيها يتم جدولة المتغيرات المراد اختبارها ووضعها في مصفوفات وبناءًا عليها يتم تغيير عدد من المؤشرات سوية ، والأفضل التأكيد على المؤشرات التي يكون لها تأثيرات كبيرة في دقة العمليات وذلك للتقليل من التجارب الواجب إجراءها لتحديد الظروف المثلى .

أنواع المشاكل

هناك بعض الأخطاء التي تكون مشتركة وتؤدي الى ظهور أكثر من مشكلة .

- الخطأ في الإعداد للتجربة مثل نسيان إضافة احد المكونات ، لذلك تضاف المكونات بالتعاقب للتأكد من عدم نسيان احدها وفق جدول مرتب .
- الخطأ في حجوم المكونات المضافة وللتخلص من هذه المشكلة يحضر خليط رئيس Mater mix والذي يحوي على مكونات التفاعل ما عدا إنزيم الكوثرة والآن يزود مع عدد التفاعل ، ويمكن بعد تحضيره خزنه لعدة أيام بدرجة حرارة 4 ْ م .
- الأخطاء والتغيرات في أداء مكائن Thermal cycler وهذه يمكن ان تؤدي الى مشاكل تتخذ عدد من المظاهر . ومن جهة ثانية توجد بعض الأجهزة المصممة للعمل بدرجات حرارة مختلفة لتساعد في أمثلة درجة حرارة التحام .
- قد تحتوي نماذج DNA القالب على مثبطات لإنزيم الكوثرة ولو انه في هذه الحالة يعد تفاعل الكوثرة أكثر تسامحا مقارنة بالتقنيات الأخرى .
- أهم الأسباب التي تؤدي الى عدم نجاح تفاعل الكوثرة هو تركيز ايون المغنسيوم لانه يتداخل مع مكونات التفاعل ، فزيادة dNTPs تقوم بسحب بعض الايونات مما يؤدي الى قلة الايونات الحرة التي تؤثر في فعالية إنزيم الكوثرة ، وكذلك تقل كمية الايون عند استعمال الدواريء الحاوية على المواد الخلابة مثل EDTA ، اذ ان الجزيئة الواحدة منها تسحب ايون واحد لذلك تؤخذ هذه الظروف بنظر الاعتبار.

• الرقم الهيدروجيني ويعد من الظروف المؤثرة العامة ، وأفضلها استعمال محيط برقم هيدروجيني 8.3 – 9 .

• التلوث ، والمعروف ان تقنية الكوثرة حساسة جدا وعرضة للتلوث مما يؤدي الى نتائج موجبة كاذبة . ويزداد خطر التلوث فيما اذا كان الهدف من الإنسان او من النواقل المستعملة بشكل روتيني في المختبرات .

ومن الاحتياطات اللازمة في هذه الحالة هي :

• استعمال المواد بكميات صغيرة كافية لاستعمال واحد . فضلاً عن عزل منطقة العمل عن الغرف الأخرى ، وتنظيف المكان بين التجارب
• استعمال ماصات صغيرة موجبة الإزاحة .
• استعمال نهايات ماصات Tips جديدة في كل مرة والأفضل ان تكون حاوية على مرشح .
• المص يجب ان يكون ببطيء ودقيق لتقليل الرذاذ .
• يجب لبس كفوف مضبوطة القياس طوال الوقت وتغيرها باستمرار.

ويمكن ان يأتي التلوث من عمليات سابقة من الأدوات مثل الأنابيب المعاد استعمالها ، جهاز الترحيل ، المحاليل وأجهزة الطرد المركزي والدواريء العامة والفينول .

ويزداد تأثير التلوث فيما اذا أريد إجراء تضخيم ثانوي اي عند الحاجة الى دورات إضافية وإعادة تضخيم المواد السابقة او عند إجراء تضخيم العنقدة .

وفي بعض الأحيان وعند اتخاذ الإجراءات المذكورة أعلاه يمكن ان يحصل التلوث وعندها يمكن اتخاذ إجراءات عامة :

• تعقيم السطوح في مكان العمل باستعمال الترطيب والمسح بمحلول 0.07 مولر من Sodium hypochlorite (اي محلول القاصر Clorox bleach بتركيز 10٪) ، وهذا يكون أفضل من استعمال حامض الهيدروكلوريك الأكال .

ويمكن استعمال الأشعة فوق البنفسجية لتعقيم المكان بالرغم من ان DNA الجاف اقل استجابة للتدمير بالأشعة فوق البنفسجية مقارنة بالنماذج الرطبة .

• تعقيم الحاويات وحوامل الأنابيب والماصات الصغيرة بالمؤصدة Autoclave اذا كانت تتحمل ذلك .

• تعقيم الكواشف والمحاليل بالأشعة فوق البنفسجية بطول موجي 254 و 300 نانومتر ، بعد وضعها في أوعية تفاعل شفافة لمدة 20 –30 دقيقة في الأجهزة الخاصة ، ويمكن استعمال الطول ألموجي 300 نانومتر لوحده ولكنه في بعض الأحيان يكون اقل كفاءة وهذا ممكن اذا كانت لا تتأثر بها ، فمثلا dNTPs بالتراكيز المستعملة في خليط التفاعل تمتص الأشعة فوق البنفسجية وتتأثر بها . ويفضل تعقيم المحاليل الخزينة كل على حدة .

تختلف البوادىء في تصرفها تجاه الأشعة فوق البنفسجية اذ يمكن ان تتكون مزدوجات الثايمين Thymine dimers وعلى العموم فالمحاليل الحاوية على تراكيز عالية تكون غير حساسة للأشعة .

اما الدواريء وعندما تكون مركزة مثل 10X فتكون غير حساسة للأشعة فوق البنفسجية وكذلك محاليل كلوريد المغنسيوم . اما إنزيم Taq فيكون حساس جدا للأشعة فوق البنفسجية . ومن الجدير بالذكر فان طبيعة الملوثات تؤثر في عملية التعقيم وإزالة التلوث . وهناك إمكانيات أخرى لإزالة التلوث مثل :

• استعمال أشعة كاما γ- ray وهي غير متوفر دائما .

• الهضم بالإنزيمات القاطعة الداخلية والخارجية وإنزيمات أخرى مثل AmpErase O uracil , N-Glycosylase (UNG) , DNA Glycosylase (UDG) وهذه غير مرغوبة نظرا لأنها تمثل إضافة قد تجلب معها تلوث جديد او تزيد من خطر التلوث ، فضلا عن ان بقاياها قد تجعل قوالب DNA المطلوبة غير ملائمة .

• استعمال المواد الكيماوية التي يمكن ان تمزج مع خليط التفاعل وتفعل لأداء دورها قبل بدء عملية التضخيم .

وهناك طرق أخرى يمكن ان تساعد في إزالة التلوث ، ويمكن دمج أكثر من طريقة لتحسين الأداء .

ومن المشاكل التي تواجه العاملين في هذا المجال :

أولا: عدم ظهور نواتج بعد التفاعل No bands

في هذه الحالة لا تتكون نواتج او تتكون بكميات قليلة ولهذا أسباب متعددة وتعد الحالة مشكلة عند عدم ظهور نواتج بعد 30 دورة ، لذلك وللتأكد من وجود المشكلة يؤخذ 1 مايكرولتر من خليط التفاعل ويضخم في خليط جديد بدلا من الإطالة وزيادة عدد الدورات خاصة عندما تكون تراكيز الهدف واطئة جدا . وبعد التأكد من وجود المشكلة يلام الإنزيم بداية كتقليد ساري ولكن قد لا يكون الإنزيم هو السبب في إفشال التفاعل

وذلك لان بعض الأحيان تكون هناك مشاكل أعمق تتعلق برداءة تضخيم البواديء او مؤشرات التدوير الحراري لذلك تؤخذ الأسباب الأخرى بنظر الاعتبار .
وفي بداية يجب التأكد من إضافة كل مكونات التفاعل بعمل جدول وتأشير الإضافات بالتسلسل ، والأفضل استعمال الخليط الرئيس Master mix الحاوي على كل المكونات ما عدا البواديء والقوالب ومن ثم معالجة المشاكل الخاصة بالقالب:

I- عدم وجود نواتج يمكن ان يشير الى عدم وجود DNA الهدف وللتأكد يتم عمل Southern blot باستعمال مجسات خاصة

II- **رداءة سلامة القالب** ويتم التأكد من ذلك باستعمال الترحيل على هلام الاكاروز باستعمال طرق استخلاص بأقل ما يمكن من قوى القص او الثلم ثم تعليقه في داريء TE برقم هيدروجيني 8 او في الماء الخالي من إنزيمات تفكيك الحوامض النووية .
ومن أوجه رداءة القالب احتواءه على نسب عالية من GC او يكون حاويا على تراكيب ثانوية ، فعندها تشجع عملية المسخ بإضافة 10 -15٪ كليسرول او 5٪ Formamide او 10٪ DMSO ، وعند استعمالها لابد من تخفيض حرارة الالتحام مع الأخذ بنظر الاعتبار ان هذه المضافات تبطئ فعالية الإنزيم الى أكثر من 50٪ اعتمادا على التركيز لذا وجب زيادة كمية الإنزيم .
وكذا الحال مع قوالبRNA التي قد تحوي على تراكيب ثانوية او غنية بـ GC لذلك يستعمل معها إنزيم مسخ عكسي ذو ثبوت عالي بالحرارة مثل AMr او RevertAid™ H minus وهي إنزيمات فيروسية تعمل بدرجات حرارة عالية وغيرها . وفي حالة القوالب الطويلة اي الأكبر من 3 كيلو قاعدة تستعمل معها طريقة Long PCR وتقلل حرارة التفاعل (الإطالة) الى 68 ْم مع زيادة وقت الإطالة الذي يكون في الحالات العادية 1 دقيقة / كيلو قاعدة .

- عدم كفاية DNA القالب وعندها يمكن زيادة كميته المستعملة او استعمال خليط رئيسي خاص او استعمال إنزيمات كوثرة حساسة جدا . اما RNA فيوصى ايضا بزيادة كميته بعد معاملة النماذج بمادة DNase I قبل إجراء عملية النسخ العكسي . وفي التوجه العام تكون جزيئة قالب واحدة كافية لإتمام التفاعل ولكن بزيادة الدورات اذ ان العدد العادي بين 25 -30 دورة يكون غير كافي . ومن جهة ثانية فان زيادة تركيز قالب DNA يمكن ان يؤدي الى إحباط تفاعل الكوثرة لانه سيرتبط الى كل البواديء الموجودة عند البداية .

- احتواء القالب على تراكيب ثانوية ولذلك يمكن استعمال طريقة الهبوط الحراري او إضافة المساعدات مثل DMSO او BSA او Betaine . او استعمال طريقة البدء الساخنة والبدء بدرجات حرارية عالية .
- قد يكون النموذج الحاوي على DNA غير نقي بما فيه الكفاية واحتمال وجود المثبطات ، وعندها يجب التأكد من نقاوة DNA وإعادة استخلاص وجبة جديدة والتأكد ان جميع الكحول الاثيلي قد تم تبخيره ، وفي هذه مثل الحالة يمكن اللجوء الى طريقة التخفيف واستعمال تخفيف 1 : 100 لتحسين تفاعل الكوثرة .

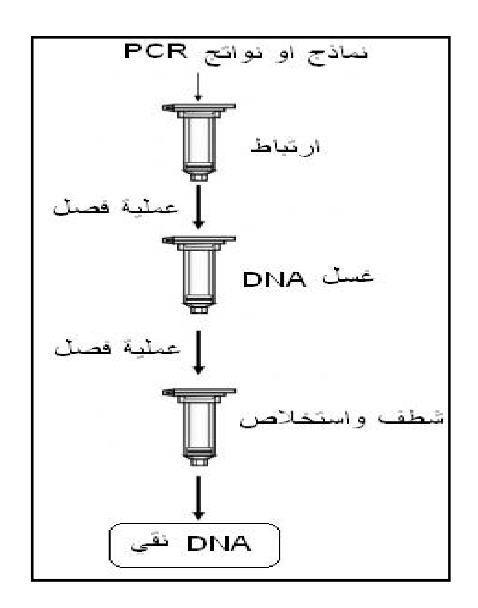
والملاحظ ان إجراء المعاملة الحرارية الأولية مثل التسخين بدرجة 95 لمدة 5 –10 دقائق تساعد في تثبيط إنزيمات Nucleases التي تؤثر في قوالب DNA وكذلك تضمن تعطيل الإنزيمات الحالة للبروتين Proteinase K التي تؤثر في بروتين إنزيم الكوثرة وتهضمه فضلا عن ان هذه المعاملة الحرارية تساعد في تفكيك التراكيب الثانوية والمركبات المعقدة في القوالب . وعند رفع درجات الحرارة يجب التأكد من سلامة الكيمياويات المستعملة وكذلك سلامة البواديء .

ويجب التأكد من ان الأشرطة المزدوجة قد مسخت الى أشرطة مفردة أثناء خطوة المسخ ، ولذلك فيمكن إطالة مدة المسخ او رفع درجة الحرارة لضمان مسخ القوالب وتوفير مواقع أكثر لارتباط البواديء ، ففي الحالات الاعتيادية تستعمل درجة 95 ْم ويمكن استعمال مزدوج حراري لقياس الحرارة لتحديد الدرجة الحقيقية للنموذج .

ومن المثبطات الأخرى غير الإنزيمات المذكورة ، قد تكون النماذج حاوية على مثبطات أيونية مثل SDS او فينول او الهيبارين وغيرها ، وعليه فإما اللجوء الى التخفيف كما ذكر أعلاه او إعادة الاستخلاص والترسيب بالكحول الاثيلي ، او إجراء عملية الفصل بالأعمدة او استعمال HPLC .

أعمدة فصل DNA

أعمدة الفصل المتوفرة Spin columns مصممة خصيصا لتنظيف وإزالة الشوائب من DNA سواء في النماذج المستعملة او عند تنظيف نواتج تفاعل الكوثرة والشكل التالي (شكل17) يوضح بعض هذه الأعمدة .



شكل 17 : أعمدة تنقية DNA

يعتمد عمل هذه الأعمدة في الفصل على امتزاز Adsorption جزيئات DNA وسعتها بحدود20 مايكروغرام ويكون ذلك بوجود داريء خاص بكل مادة . وبعد ارتباط DNA تبقى بقية المواد التي يتم التخلص منها عن طريق غسل جزيئات DNA المرتبطة بعمود الفصل بداريء الغسل Washing buffer ، ثم يتم استرداد DNA بواسطة داريء الاسترداد Elution buffer ، ويكون DNA الناتج نقيا وجاهزا للمعالجات او الاستعمالات الأخرى . بعض هذه الأعمدة تكون خاصة بجزيئة DNA المستخلص من الهلام وأخرى خاصة بتنظيف نواتج تفاعلات الكوثرة حيث يتم التخلص من البواديء والتواليات الأقل من 40 قاعدة والإمساك بنواتج PCR بحدود 20 مايكروغرام . فهذه الأعمدة تساعد في الحصول على DNA دون استعمال الفينول / الكلوروفورم والترسيب بالكحول الاثيلي . والأعمدة الخاصة بمنتج PCR من يمكن ان تستعمل لأجل زيادة تركيز جزيئات DNA فضلا عن فصل الشوائب مثل الأملاح والبروتينات . واذا كانت نواتج تفاعل الكوثرة تحوي على نواتج غير متخصصة لذلك يفضل أولا فصلها على هلام الاكاروز ثم استعمال العدة الخاصة DNA gel extraction kit .

وتوجد أعمدة لتنظيف وتنقية مستحضرات البلازميدات ، وكذلك توجد أعمدة لتنظيف DNA من مختلف الشوائب ثم استعمالها في الكلونة او تحديد التواليات .

وما ذكر آنفا حول نماذج DNA يمكن ان يسري على قوالب RNA التي يجب التأكد من سلامتها ونقاوتها وخلوها من إنزيمات تقطع RNA وهي RNases قبل تحضير cDNA منها بإنزيم النسخ العكسي .

III – الخطأ في تركيز الأملاح والشوائب الكيماوية

ويعد هذا من الأسباب المهمة في عدم ظهور او تكون نواتج تفاعل الكوثرة . فارتفاع ايونات المغنسيوم والايونات الأخرى مثل K^+ ربما يؤدي الى تفاعلات غير مرغوبة .

لذا يجب إعادة تنقية نماذج القالب وفصل الأملاح اما باستعمال أعمدة الفصل او إعادة الترسيب بالكحول الاثيلي ثم غسلها بمادة 70٪ كحول اثيلي . وكذلك الحال مع نماذج RNA التي يمكن ان تحوي على الأملاح او غيرها من الشوائب التي تثبط إنزيم النسخ العكسي .

ومن الشوائب الكيماوية التي يمكن ان تؤثر في التفاعل عند وجودها في نماذج القالب هي EDTA ، SDS ، أملاح الكوانيدين ، الفوسفات ، Pyrophosphates والأمينات المتعددة مثل Spermdine وغيرها والتي يمكن ان تبقى من عمليات الاستخلاص او غيرها من المعالجات للنموذج . لذلك يصار الى تنقيتها بالترسيب الكحولي ثم غسلها بـ 70٪ من الكحول الاثيلي او استعمال أعمدة الفصل .

ومن أهم المواد الكيماوية المؤثرة في هذا المجال هو تركيز ايون المغنسيوم عندما يكون غير كافيا والذي يمكن ان يؤدي الى عدم حصول تفاعل الكوثرة ، وذلك لان الايون يرتبط الى النيوكليوتيدات والبواديء وقالب DNA . لذلك كانت الحاجة ماسة لأمثلة التركيز لكل تفاعل ، والتركيز الموصى به 1–4 ملي مول . فمثلا عند وجود 0.2 ملي مول من dNTPs ووجود إنزيم Taq ووجود الداريء الحاوي على KCl فالأفضل استعمال تركيز نهائي للايونات الحرة 1.5 ملي مول من مصدر المغنسيوم في حين عند وجود المكونات هذه ولكن داريء الإنزيم يحوي على كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ يزاد تركيز المغنسيوم الى 2 ملي مول مما يشير الى تداخل هذه العوامل فيما بينها . ويتأثر عامل تركيز ايون المغنسيوم بنوعية الإنزيم المستعمل فعند استعمال Pfu بدلا من Taq فيفضل البدء بكمية 2 ملي مول من كبريتات المغنسيوم $MgSO_4$ ويختلف التركيز عند استعمال $MgCl_2$.

وكذلك الحال اذا احتوى نموذج قالب DNA على مادة خلابة مثل EDTA التي تخلب كل جزيئة منها ايون مغنسيوم واحد عندها وجب زيادة تركيز ايون المغنسيوم . كما ان بعض التفاعلات تحتاج الى زيادة تركيز dNTPs وعندها يجب زيادة تركيز ايون المغنسيوم .

وعلى العموم فان زيادة تركيز ايون المغنسيوم المفرط يمكن ان يؤدي الى ظهور المسحات او حزم إضافية ، ويجب التأكد من التركيز عند كل تفاعل وذلك بالتحري عن التركيز الأمثل بإجراء تجارب بظروف متشابهة ولكن بتراكيز مختلفة من ايون المغنسيوم والبدء بـ 1.5 ملي مول وبزيادة 0.5 ملي مول الى حد 4 ملي مول للوصول الى التركيز الأمثل .

IV- الخطأ في تصميم البواديء

موضوع تصميم البواديء سيفرد فصل خاص به ، ولكن نظرا لتأثيرها في العديد من الجوانب كان لابد من المرور عليها بسرعة اذ ان الخطأ في البواديء تتخذ نتائجه مظاهر عدة .

فالبواديء تعد الأساس في عملية الكوثرة ، وتستعمل البواديء بتراكيز كافية والتي يتراوح بين 0.1 – 1 مايكرومول ، ويعد البدء بتركيز 0.4 مايكرومول جيدا لبدء عملية الأمثلة في هذا الجانب على شرط ان تكون الظروف الأخرى غير مؤثرة ، ان التركيز في البداية يعتمد على ظروف عدة منها عند استعمال Long PCR او عند استعمال البواديء المشتتة فان اقل تركيز موصى به يكون بحدود 0.5 مايكرو مول . وتؤثر طبيعة قالب DNA في أداء البواديء فمثلا يجب التأكد من ان الانترونات لجينات حقيقيات النواة لا تكون موجودة ضمن القطعة التي سترتبط اليها البواديء (الأمامي والعكسي) وذلك لاحتمال ان البواديء الأيمن والأيسر تجد مكملاتها في مناطق بعيدة عن منطقة الهدف ولذلك يجب ان يتم التأكد منها باستعمال دراسات الحاسوب *In Silico* مثل استعمال برنامج BLAST .

ويكون من الضروري قبل البدء باستعمال البواديء المصممة إجراء دراسة حاسوب باستعمال BLAST للتأكد من تخصص البواديء لمنطقة الهدف ، وفي حالة عدم القبول يمكن ان يصار الى استبدال البواديء ، وتسري هذه الضرورة على البواديء الخاصة بجينات RNA ، والتي يفضل معها استعمال بواديء عشوائية (Random hexamer primers) تتكامل على الأقل مع الطرف '3 .

ومن جهة ثانية تكون تواليات البواديء عرضة لتأثير إنزيمات Exonucleases وهي السمة المميزة لبعض إنزيمات الكوثرة عدا Taq مثل Pfu او Vent لذلك عندها يجب إضافة آصرة تمنع ذلك كما في Phosphorothioate primers التي مر ذكرها في موقع سابق . ويمكن التأكد من تفكك البادئ باستعمال Denaturating polyacrylamide gel . وفي حال استنفاد كل المحاولات لتعديل الخطأ الناتج عن البواديء يمكن التخلي عن البواديء المستعملة واستعمال بواديء مصممة جديدة .

V إنزيمات الكوثرة Polymerases

تشمل إنزيمات الكوثرة إنزيمات مختلفة يمكن ان تستعمل في تفاعل الكوثرة أهمها Taq المستعمل بكثرة والذي تنقصه قابلية التصحيح لذا يمكن ان تظهر معه الأخطاء ، وإنزيم Pfu او Vent او غيرها التي مر ذكرها سابقا .

والتراكيز الموصى بها بالنسبة لإنزيم Taq لحجم تفاعل 50 مايكرولتر هو إضافة 1 –1.5 وحدة ، وبالنسبة لإنزيم Pfu هو 1.25 – 2.5 وحدة ولكن سجلت بعض النجاحات باستعمال 0.1 وحدة في حجم تفاعل 20 مايكرولتر . ويكون من الضروري زيادة كمية الإنزيم في بعض الحالات مثل عند وجود المثبطات المختلفة ذات المصادر المختلفة ، فضلا عن زيادتها في حالة استعمال المضافات التي تؤدي الى تقليل فعاليات إنزيمات الكوثرة بنمط يعتمد على التركيز المستعمل .

والقاعدة العامة ان فعالية إنزيم Taq في الإطالة تصل الى 1 كيلو قاعدة / الدقيقة وPfu تكون 2 كيلو قاعدة / الدقيقة . وفي حالة الإسراع وتغير الظروف يمكن الوصول الى إطالة تصل الى 1 كيلو قاعدة / 25 ثانية . ودرجات الحرارة التي تعمل فيها إنزيمات الكوثرة هذه حوالي 72 ºم ولكن عند استعمالها في إطالة قوالب كبيرة تصل الى 3 كيلو قاعدة فلابد من تخفيض الحرارة الى 68ºم . ولكن مع تذكر ان لكل إنزيم عمر نصفي خاص فمثلا إنزيم Taq يكون بحدود 40 دقيقة .

VI- عدد الدورات او التدوير Cycling

يختلف عدد الدورات المستعملة اعتمادا على الظروف المستعملة ومنها كمية قالب DNA في خليط التفاعل والحاصل المتوقع من العملية وفي اغلب التطبيقات يكون عدد الدورات بين 25 –35 دورة كافيا لإعطاء الحاصل الملائم . ولكن عند استعمال نسخ قليلة من قوالب DNA مثل اقل من 10 نسخ فعندها يجب زيادة عدد الدورات الى 40 دورة او أكثر . وفي هذا المجال يجب الانتباه الى ان جهاز التسخين يعمل بشكل صحيح وان عملية البدء والانتهاء تعمل بشكل صحيح .

وبعض الأحيان يكون من الضروري التحكم بعدد الدورات ضمن مدى حراري معين كما في حالة استعمال طريقة الهبوط الحراري TD فمثلا عند البدء بالطريقة واستعمال عدد نسخ تتراوح بين 10^4- 10^5 من قالب DNA يستعمل عدد الدورات العادي وفي حالة عدم وجود نواتج يزاد عدد الدورات 10 بدرجة حرارة الالتحام المطبقة . وهنا تتدخل عوامل أخرى مثلا إعادة تضخيم تركيز معين 1 مايكروغرام او استعمال تخافيف مختلفة من النموذج 1: 10 – 1: 1000 وبدرجات التحام ثابتة والتلاعب بعدد الدورات .

VII– درجات الحرارة

اختلفت تفاعلات الكوثرة التي تجري خارج الأنظمة الحية عن تلك التي تجري داخل الأنظمة الحية بنمط درجات الحرارة المطبقة . لذلك كان عامل درجة الحرارة من العوامل

الحاكمة في نجاح التفاعل وتتداخل مع عوامل أخرى . وهناك بعض الاحتياطات الواجب استعمالها لضمان الوصول الى درجات الحرارة المختلفة بالسرعة الممكنة مثل استعمال أنابيب رقيقة الجدارن سريعة التوصيل . ونسق الدرجات الحرارية يتكون من أكثر من مدى :
1) المدى الأول هو المتعلق بحرارة الانصهار Tm والتي تحدد بدورها حرارة الالتحام Ta (كما ورد سابقا) . وتتأثر درجة حرارة الانصهار بمدى تطابق البادىء مع القالب ، وبعض الأحيان يكون من الضروري استعمال بواديء فيها درجة من عدم التلاؤم ، وفي هذه الحالة تحسب درجة الانصهار بالمعادلة الآتية :

$$Tm = 81.5 + 0.41\ (\%GC) - 675\ /N - \%\ mismatch$$

N تمثل عدد القواعد في البادىء
ومن الملاحظ ان لنسبة GC أهمية في تحديد حرارة الانصهار ، فضلا عن ان حرارة الانصهار يمكن ان تتغير عند وجود المضافات .
2) درجات حرارة الالتحام Ta وهي التي تحدد بشكل تقليدي اعتمادا على حرارة الانصهار Tm وذلك بإنقاص 5 درجات ، ويمكن الوصول اليها باستعمال بداية ساخنة ثم النزول ببرامج خاصة بدرجات الحرارة باستعمال Gradient thermocycler الذي يغطي مدى من درجات الحرارة بين 10 –15 ْم . وبعض الأحيان يستعمل النمط العكسي وهو البدء بدرجة حرارة واطئة مثل 37 ْم وزيادة درجات الحرارة على مراحل لحين الوصول الى الدرجة المثلى وفي حالة تكرار المشكلة فيجب النظر الى أسباب أخرى .
3) درجة حرارة الإطالة Extension temp
اغلب إنزيمات الكوثرة المستعملة تعمل بفعالية عند حرارة 70 – 72 ْم عند تضخيم أهداف بطول 200 –600 قاعدة ويكون المعدل 1 كيلو قاعدة /دقيقة ولكن عند العمل مع أهداف طويلة مثلا أطول من 20 كيلو قاعدة فان الوقت سيطول لذلك تخفض الحرارة وتستعمل 68 ْم .

VIII- تراكيز النيوكليوتيدات

النيوكليوتيدات هي الأخرى تعد من المقومات الأساسية في تفاعلات الكوثرة ، فبدأً يجب ان تكون بكميات وافية ومتوازنة بالنسبة للنيوكليوتيدات الأربعة ، وزيادتها يمكن ان تثبط تفاعل الكوثرة ، كما انها تسحب نسبة من ايونات المغنسيوم ، ويمكن ان تستغل في تحوير نواتج التفاعل مثل استعمال dUTP وعندها تستعمل إنزيمات تنقصها خاصية التصحيح مثل إنزيم Taq الذي يدمج dUTP ولكن بكفاءة اقل ، او استعمال نسب عالية من dNTP : dUTP للوصول الى حاصل جيد . ومحاليل هذه النيوكليوتيدات عرضة للتلوث لذلك تقسم الى أحجام صغيرة تكفي لتفاعل واحد وكذلك لتجنب عمليات التجميد والانصهار التي تؤثر فيها .

أسـباب أخـرى :

فضـلا عـن مـا ذكـر أعلاه من الأسـباب وعـدم ظهـور نواتـج ولكـن حـقيقـة الأمــر ان التفاعــل قـد تم وأنتجـت النـواتـج ولكـن الخطأ في الكشــف عنــها او تكــون التفــاعلات قــد حصــلت ولكـن بكفـاءة واطئــة لــذلك تحــدد هــذه باســتعمال الجســات او عمــل Blotting او يعــاد التضـخيم باسـتعمال بـوادىء العنقـدة Nested primers وخاصــة للقطــع الخارجيــة مــع اسـتعمال التخافيـف مثـل تخفيـف النمـوذج 1: 100

الجانب الثـاني قـد يكـون هنـاك خطـأ في تحليل الهـلام الـذي فصلـت عليـه النـواتـج ، لـذلك يتـم التأكـد مـن ان الحفـر في الهـلام قـد حملت بشـكـل صـحيح وان داريء التحميـل قـد أضــيف واستعمـل بشـكـل صحيـح والتأكـد مـن اســتعمال محلــول البرومـيــد للإظهــار وانــه قــد اسـتعمل بشـكـل صحيـح وان عمليـة الإظهـار باسـتعمال الأشـعة فـوق البنفسـجيـة تســير بشـكـل صحيـح .

ثانيا : الحصـول علـى حاصـل قليـل Low yield

تكـاد تكـون معظـم المثبطـات في الحصـول علـى نــواتـج مشــابهـة للحصــول علــى حاصــل قليـل ولكـن بوطأة اقـل . وكـمـا متوقـع ان الحصـول علـى حاصـل قليـل يكـون هـو الآخـر متعـدد الأسـباب ومنهـا :

- كميـة قـوالـب DNA قليلـة وتعـالـج بزيـادة عـدد دورات التفـاعـل .
- رداءة القـوالـب مثـل كونهـا غنيـة بـــ GC لــذلك تضــاف المــواد المســاعدة مثــل BSA ، DMSO وغيرهــا . وتســتعمـل طريقــة البــدء الســاخنة مــع اســتعمال داريء جديــد . وكـذلك وجـود تراكيــب ثانويــة في قالــب DNA ويمكــن معالجتــها باســتعمال طريقــة الـهبـوط الحــراري TD ، او اســتعمال المضــافات المشــجعـة واســتعمال طريقــة البــدء السـاخنـة .
- قـد يكـون مصـدر DNA المستهـدف غيـر نظيـف ويحـوي علـى المثبطـات لــذلك احتاجـت العمليـة الـى التأكـد مـن تبخـر كـل الكحـول الاثيلـي المستعمـل في الاسـتخلاص ويمكــن اسـتعمال نماذج مخففـة او اسـتعمال أعمـدة الفصـل لتنقيـة DNA .
- قـد تكـون كميـة البـوادىء هـي السـبب لـذلك تـزاد كميتهـا في خليـط التفـاعـل
- تركيز $MgCl_2$ ليسـت عنـد الحـدود المثاليـة لـذلك يتـم تحديـد التركيــز الأمثــل بزيــادة 0.5 ملـي مـول علـى مـدى 1.5 –4 ملـي مـول .

- الدواريء المستعملة في التفاعل ليست مثالية للتفاعل ، لذلك تستعمل دواريء كوثرة تحوي على ايون الامونيوم NH_4^+ وزيادة كمية KCl في الداريء لانها تؤدي الى زيادة الحاصل .
- قد تكون درجات حرارة الالتحام غير ملائمة لذلك تجرى تفاعلات مختلفة باستعمال درجات حرارية متدرجة بزيادة 2°م لكل تفاعل لحين الوصول الى الحد الأمثل .
- يمكن ان تكون مدة الإطالة قصيرة ، لذلك ففي الأهداف الأكبر من 2 كيلو قاعدة يجب ان يكون الوقت (بالدقائق) مساويا لعدد الكيلوات (Kb) من المادة المتضخمة Amplicon .
- عملية المسخ الطويلة يمكن ان تؤدي الى مسخ إنزيم الكوثرة ، لذلك فاستعمال 2 دقيقة تكون كافية عند استعمال الإنزيمات وكون العملية لا تحتاج الى شرط البداية الساخنة .
- حصول عملية التبخر أثناء التدوير الحراري ، لذلك يتم التأكد من الحجوم وتعديلها ، والتأكد من أغطية الأوعية ، وغطاء جهاز تدوير الحرارة واستعمال أغطية ذات قابلية التصاق قوية وذات جودة عالية .

ثالثا : ظهور حزم غير مرغوب فيها .

ظهور الحزم غير المتخصصة Non–specific bands او ظهور المسحات Smears وهي ما يطلق عليها Jumping PCR والتي لا يمكن التخلص منها باستعمال كوثرة العنقدة لذلك لان الأسباب تبقى حتى عند استعمال بواديء للمناطق الداخلية . وظهور الحزم غير المتخصصة يمكن ان تشارك فيها كل مقومات تفاعل الكوثرة وكذلك ظروفها ومنها :

- **قالب DNA** ، أفضل تركيز لنموذج القالب في حجم تفاعل 50 مايكرولتر وكما ذكر في مواقع أخرى هو 0.01 –1 نانوغرام للبلازميدات والعاثيات و 0.1 نانوغرام DNA الجينومي gDNA لان الكميات الأكبر يمكن ان تؤدي الى ظهور حزم غير متخصصة لذلك تقلل الكمية . كما ان تفكك قالب DNA يمكن ان يؤدي الى ظهور مثل هذه الحزم لذلك يجب تقليل عمليات التجميد والإذابة للنماذج قبل استعمالها والتأكد من سلامتها بالترحيل على الهلام .

- **البواديء** وهذه يجب العناية بتصميمها واختيارها لانها تؤدي الى نواتج غير متخصصة ، فالبواديء غير المتخصصة يمكن ان ترتبط الى مناطق غير مستهدفة في التواليات وتضخم مناطق غير مطلوبة ، فضلا عن التأكد من ان الباديء لا يتكامل مع نفسه ولا مع جزيئات الباديء الآخر . لذا تدرس البواديء على الحاسوب *In Silico* باستعمال

BLAST للتأكد من انها تتكامل مع الهدف ويتم تجنب البوادىء التي فيها مكررات مباشرة Direct repeats . فضلا عن التأكد من الشروط الأخرى اللازمة للبوادىء الجيدة . وعند إتمام عملية التأكد يستعمل البوادىء بالتركيز الموصى به وإلا يتم تقليلها او زيادتها وفقا للتجربة . ولتجنب تضخيم gDNA تصمم البوادىء على الحدود بين الاكسون – الانترون وإزالة gDNA من النموذج باستعمال DNase I الخالي من RNases .

• **الدواريء وتركيز المغنسيوم** تعد من الأسباب المهمة في ظهور هذه المشكلة فالمعروف ان زيادة تركيز ايون المغنسيوم تؤدي الى ظهور نواتج غير متخصصة والتركيز الأمثل يكون بين 1– 4 ملي مول ولإيجاده تتبع الخطوات المذكورة أعلاه والخاصة بتحديد التركيز ولكن عند زيادة التركيز يجب مراعاة الحفاظ على تركيز dNTPs ثابتا .
وبعض الأحيان يكون الداريء ليس ملائما لذلك يمكن استبدال الداريء المعتمد على KCl بدلا من ايون الامونيوم $NH4^+$ لزيادة التخصص ، ويمكن رفع تركيز كلوريد البوتاسيوم الى 1.2 X – 2 X ولكن بالحفاظ على تركيز كلوريد المغنسيوم عند تركيز 1.5 –2 ملي مول .

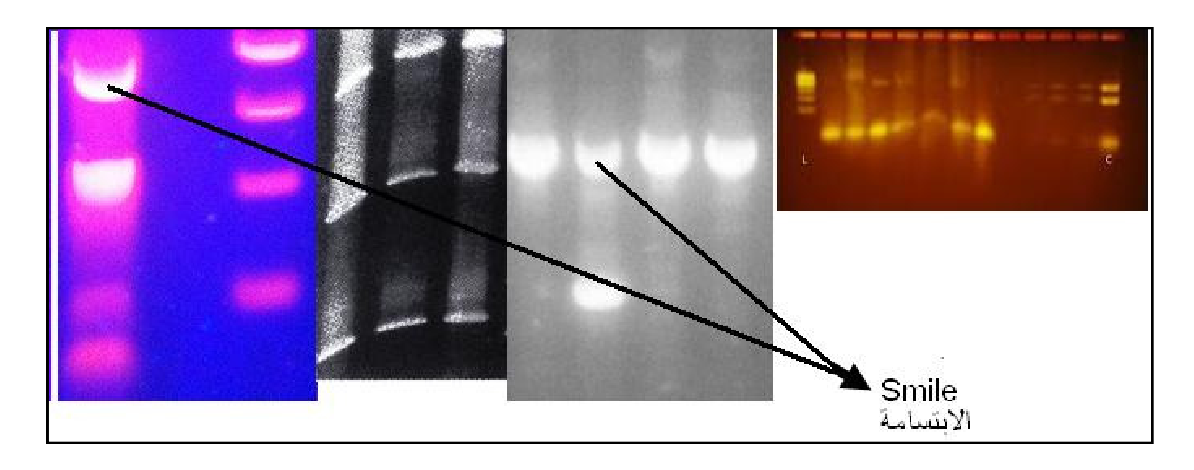
• **إعداد خليط التفاعل** ان لم يكن ملائما يمكن ان يؤدي الى هذه المشكلة . فعند الإعداد بدرجة حرارة الغرفة يجب إضافة إنزيم الكوثرة (Taq) في آخر خطوة ، وان لم يكن كذلك فمن الضروري حفظ وإعداد الخليط بحرارة الثلج وذلك لان الإنزيم له بعض الفعاليات عند درجات الحرارة الواطئة وإنتاج نواتج غير متخصصة ، او استعمال طريقة البدء الساخنة باستعمال الإنزيمات المحورة لهذا الغرض اي الإنزيمات التي تنشط بدرجات حرارة عالية وليس حرارة الغرفة .

• **العناية بدرجات الحرارة** المختلفة وزمن تطبيقها ، فقد تكون درجة حرارة الالتحام غير مثالية ، لذا يتم تخفيضها باستعمال Gradient thermocycler الذي يغطي مدى ± 10 مْ ، ودرجة الحرارة هذه يجب ان تغير الى الأمثل بعد الأخذ بنظر الاعتبار المضافات المستعملة في خليط التفاعل . كما يجب الانتباه الى مدة الالتحام فقد تحتاج الى تقصير
.

اما تفاعل الإطالة ودرجة حرارته هي الأخرى يجب التأكد منها فوقت الإطالة لأهداف اكبر من 2 كيلو قاعدة يجب إضافة دقيقة واحدة من الزمن لكل كيلو قاعدة إضافي ، ويمكن ان يقلل وقت الإطالة اعتمادا على الظروف الأخرى .
• زيادة إنزيمات الكوثرة يمكن ان تؤدي الى ظهور حزم غير متخصصة ، لذلك وبعد التأكد من الظروف أعلاه يمكن تقليل كمية الإنزيم المستعمل .

رابعا : ظهور نمط غير مثالي للحزم

يفترض في التفاعل المثالي والفصل المثالي ان ينتج حزم أفقية على الهلام ولكن بعض الأحيان تظهر حزم مشوهة كما موضح في الشكل (18)



شكل 18 : تشوه حزم DNA

وظهور هذه الحزم المشوهة له أسباب متعددة وتقارن عادة بسلم الواسمات فيما اذا كان السبب عاما او ان مسار ما يمكن ان تظهر فيه حزم مشوهة في حين يكون مسار سلم الواسمات طبيعي ومن هذه الأسباب :

- عند تشوه سلم الواسمات ينظر الى نوع الواسمات المستعملة فإذا كانت مشتقة من العاثي λ فان نموذجها يحتاج الى تسخين ، لان استعمال العاثي λ وهضمه يجب ان يسخن بدرجة حرارة 65ْم لمدة 5 دقائق ثم يبرد على الثلج قبل التحميل على الهلام لتدمير النهايات اللاصقة البالغة 12 نيوكليوتيد في مواقع الالتصاق Cos sites التي قد تلتحم وتكون حزم إضافية ، اما باقي مصادر الواسمات فلا تحتاج الى تسخين .
- يفضل استعمال صبغة التحميل وداريء التحميل نفسه لكل من سلم الواسمات والنماذج وعند التخفيف يستعمل داريء صبغة التحميل (1X) واستعمال أحجام متساوية منهما عند التحميل .
- التحويرات التي تجري على قالب DNA مثل المثيلة او إضافة البايوتين او استعمال صبغات متألقة كبيرة الوزن يؤدي الى إبطاء حركة الجزيئات مقارنة بالجزيئات ذات الحجم نفسه غير المحورة .

- يتداخل البروميد المستعمل بشكل تقليدي في صبغ النواتج ويؤثر في عمليات فصل القطع الكبيرة . لذلك يصبغ الهلام المستعمل في فصل قطع اكبر من 20 كيلو قاعدة او DNA الملتف Supercoiled DNA بعد اكتمال الترحيل والفصل بمحلول يحوي 0.5 مايكروغرام /مللتر لمدة 30 دقيقة .
- طبيعة تركيب القالب المختلف ، وهذه تؤدي الى جعل الحزم من مصادر DNA مختلفة وبتواليات مختلفة ولكن لها الحجم نفسه ترحل لمسافات مختلفة . فالقطع الغنية بقواعد T، A تسير بشكل أبطأ من القطع المساوية لها في الحجم والغنية بقواعد C، G .
- تسير الحزم بشكل يختلف عن سير سلم الواسمات اذا كان هناك شذوذ في التراكيب مثل وجود ثلم في القطعة او وجود تركيب حلزوني او مزدوجات من الجزيئات ومثل هذه تظهر حركة مختلفة على الهلام مقارنة مع قطع DNA المكافئة او ذات الحجم القياسي المشابه .
- يظهر النمط المشوه ايضا عندما لا يكون الهلام مغمورا بشكل جيد في داريء الترحيل ، والغمر يكون ضروريا أثناء عملية تحميل النماذج وكذلك عملية الترحيل .
- قد يكون السبب حجم النموذج ، لان حجم النموذج وكذلك حجم نموذج الواسمات الوزنية يجب ان يكون كافيا ويملا على الأقل ثلث سعة الحفرة ، ولذلك لا تستعمل الحفر الكبيرة مع الحجوم الصغيرة واذا كان ذلك غير ممكنا فيزاد الحجم باستعمال داريء تحميل الصبغة (1X) .
- قد يكون التشوه ناتجا عن وجود فقاعات هوائية او بعض الجزيئات الغريبة في حفر الهلام او في الهلام نفسه . لذلك تستعمل أوعية نظيفة لتحضير الهلام واستعمال ماء نقي او داريء نظيف للتحضير . كما يجب العناية بصب الهلام وببطء لتجنب تكون الفقاعات ، وان كان بالإمكان إزالتها فتزال بأطراف الماصات قبل البدء بالترحيل وبعد عملية الغمر بالداريء.
- تشوهات مثل الحزم المنحنية يمكن ان تظهر لأسباب متعددة ذكر بعضها انفا مثل قلة النموذج المستعمل او تظهر ايضا عند استعمال فولتية غير مستقرة لذا يعاد الترحيل بعد حساب الفولتية الملائمة التي تراوح بين 4 -8 فولت/سم . وللتقليل من انحناء الحزم تستعمل فولتية واطئة لعدة دقائق عند بدء الترحيل ثم ترفع لتكون مستقرة عند الحدود المعروفة . وعند استعمال الترحيل السريع مثل 23 فولت/سم فيفضل استعمال واسمات وزنية خاصة ودواريء خاصة وتحسب الفولتية اعتمادا على طول الهلام .

- يجب العناية بالفولتية المسلطة على طرفي الهلام لان الفولتية العالية تؤدي الى تسخين الداريء وصهر الهلام لذلك تستعمل المعادلة التي تربط بين طول الهلام وقيم الفولتية اللازمة ويتم الترحيل الى ان تصل الصبغة المستعملة لتقفي اثر حركة النموذج الى حد معين ، فيتم توقيف الترحيل عندما تصل صبغة Bromophenol blue الى ثلثي طول الهلام اما عند استعمال Orange G فيتم إيقاف الترحيل عندما تصل الى أربعة أخماس طول الهلام .
- قد يكون الداريء المستعمل للترحيل غير مناسبا وذلك يعتمد على حجم القطع المرحلة . فعندما يتوقع ان يكون حجم القطع اكبر من 1500 قاعدة او ترحيل Supercoiled DNA فيستعمل الداريء TAE. اما الداريء TBE فيصلح لترحيل القطع الأصغر من 1500 قاعدة ويصلح ايضا عند استعمال Polyacrylamide gel تحت ظروف المسخ . والملاحظ ان القطع الكبيرة لا تنفصل بشكل جيد عند استعمال داريء البورات (TBE) .
- يجب ان تكون نسبة الاكاروز صحيحة وتكون أساسية في فصل القطع ذات الأحجام المختلفة ، لذلك يجب ان يصحح حجم المحلول بالماء للتعويض عن التبخر أثناء عملية الغلي وإلا فان تركيز الاكاروز سيرتفع ويؤدي الى فصل رديء للحزم خاصة قطع DNA الكبيرة .

خامسا : ظهور نواتج متعددة

يمكن ان تظهر نواتج متعددة بعد الفصل او تظهر مسحات على الهلام ولها أسباب :

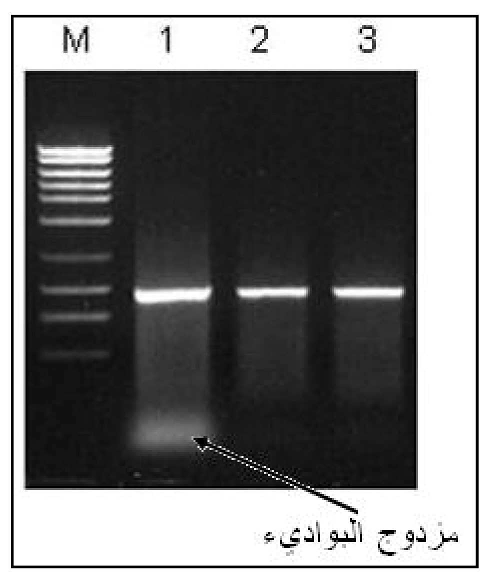
- أهم أسباب هذه المشكلة هو البواديء غير الجيدة ، فقد تكون البواديء غير متخصصة وترتبط الى مناطق غير مستهدفة وتؤدي الى ظهور نواتج متعددة عند الفصل ، اي يحصل ارتباط للبواديء في المناطق الصحيحة وأخرى غير صحيحة ، لذا يتم إعادة التأكد من الباديء والمناطق التي يرتبط اليها بإجراءات دراسات الحاسوب واستعمال برنامج BLAST مع قواعد البيانات العامةPublic databases ، وإلا يعاد تصميم باديء جديد قبل الاستعمال وتجربة تقليل تركيز البواديء او زيادتها لملاحظة الفرق ، وفي حالة الحاجة الى تغيير إنزيم التفاعل (Taq المستعمل بكثرة) يفضل استعمال البواديء المحورة Phosphorothioate primers عند استعمال إنزيم Pfu ، لمنع تكون بواديء صغيرة من البواديء الأصلية وقيامها بتضخيم أهداف غير مطلوبة .
- يكون ظهور نواتج إضافية او متعددة نتيجة ان الجين تحت الدراسة له أكثر من نظير اي وجود Isoforms او وجود تغايرات أثناء عمليات الفصل Splice variants .

- يمكن ان تظهر النواتج المتعددة نتيجة تفاعلات الكوثرة المبكرة غير المتخصصة أثناء عمليات الإعداد للتفاعل وهذه يمكن التخلص منها بإجراء عمليات الخلط في محيط ثلجي او استعمال طريقة البدء الساخنة بأنزيماتها المحورة .
- قد تظهر نواتج متعددة نظرا لكون تركيز كلوريد المغنسيوم ليس عند الحدود المثلى ، ولذلك يحدد الأمثل منه بإجراء تجارب بفارق 0.5 ملي مول وبمدى يبدأ بـ 1.5 ملي مول وينتهي بقدر 4 ملي مول كما ذكر في معالجة مشاكل أخرى .
- قد تكون المشكلة ناتجة عن عدم ملائمة حرارة الالتحام وعندها يجب تجربة عدة درجات حرارية متدرجة بفارق 2ْم ، وعند الوصول الى الدرجة المثلى يقصر وقت الالتحام . ويفضل التحرك للأعلى في طريقة TD والأفضل استعمال برنامج يحدد استعمال التغيير بدرجة مئوية واحدة لكل 3 دورات ، وهذا يحتم إلغاء الدورات الأخيرة لمنع ظهور المسحات .
- التلاعب بتركيز قالب DNA المستعمل فقد يزاد او يقلل التركيز للوصول الى الحالة المثلى
- التأكد من الدواريء ومكونات التفاعل ، ففي العادة يصار الى استعمال داريء أساسه KCl بدلا من استعمال $NH4^+$ لزيادة التخصص . ويمكن تغيير تراكيز المكونات وتغيير الرقم الهيدروجيني والإنزيم و dNTPs وحتى البواديء .
- في حالة النواتج المتعددة قد يكون التلوث هو السبب واستعمال طريقة التأكد NTC (Check no template control for bands) .
- عند حصول المشكلة يمكن إعادة تضخيم القطعة المطلوبة باستخلاصها من الهلام بعد قطعها وتعريضها لدورات من التجميد والانصهار لتنضح من الهلام او هضم الهلام لاستخلاص DNA الحزمة منه ، وفي بعض الأحيان يكون كافيا سحب نموذج بالماصة الدقيقة او اخذ نموذج من الحزمة بعودة الأسنان ويفضل ان تكون بلاستيكية واستعمالها في تفاعل كوثرة جديد .
- إعادة تضخيم النموذج المستعمل ولكن بالتخافيف 10^{-4} –10^{-5} باستعمال طريقة تضخيم العنقدة .

سادسا : تكوين مزدوجات البواديء Primer dimers (PD)

يعد تكوين مزدوجات البواديء من المشاكل العامة وسببها الأساسي هو عدم انضباط تصميم البواديء . وعمليا تظهر المزدوجات كما موضح في الشكل 18 على شكل حزم بحدود 30 –50 قاعدة او مسحة ذات كثافة عالية او واطئة والكشف عنها بالهلام طريقة ملائمة جدا .

والناتج من مزدوجات البوادىء يكون صغير الحجم لذلك يتحرك أسرع من النموذج كما موضح في الشكل 19.



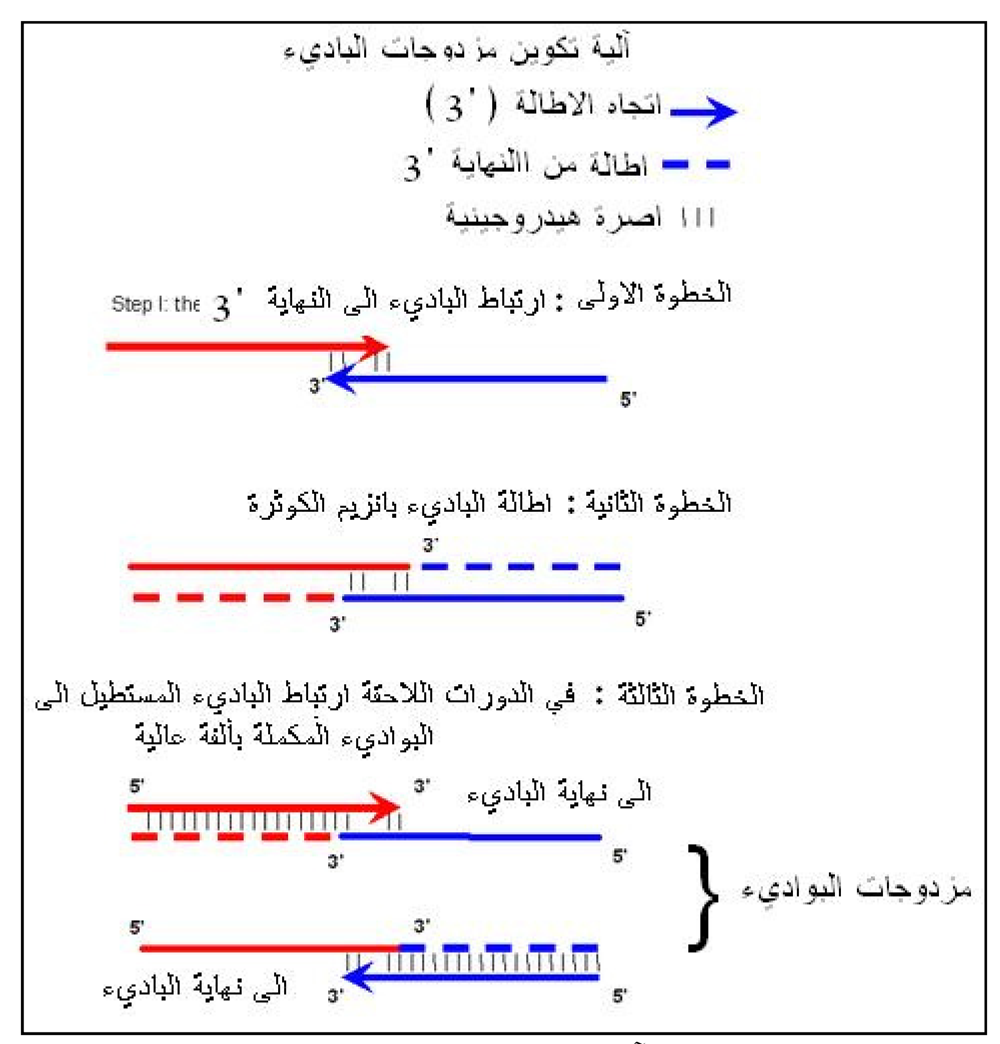
شكل 19 : مزدوجات البوادىء

وتتضمن آليات تكوين البوادىء ثلاث خطوات رئيسية ، في الخطوة الأولى يلتحم اثنين من البوادىء مع بعضهم عند النهاية `3 وعندما يكون الناتج ثابتا بما فيه الكفاية فان إنزيم الكوثرة سيقوم بإطالة الأشرطة كما في الخطوة الثانية . اما الخطوة الثالثة هي التي تحدث في الدورة القادمة ، اذ تستعمل الأشرطة المفردة التي تكونت في الخطوة السابقة كقوالب التي ترتبط بها جزيئات باديء جديد مؤدية الى تكوين نواتج جديدة من مزدوجات البوادىء .

وهذه بعض الأحيان لا تكون مهمة جدا لان البوادىء تضاف عادة بتراكيز عالية وحتى بعد ارتباطها يفترض ان تبقى كميات منها لإجراء التفاعل ، ولكن استنزاف مكونات التفاعل وتغيير بيئة التفاعل لا يمكن التغاضي عنها ، خاصة في الدورات الأخيرة من التفاعل .

ان تكون المزدوجات يؤدي الى نتائج مضللة ، ويقوم باستهلاك البوادىء ومكونات التفاعل . وعلى العموم يوجد نوعين من مزدوجات البوادىء هي المزدوجات المتجانسة Homodimer وهي التي تحدث بين جزيئات الباديء الواحد Intermolecular self dimer والمزدوجات المتباينة Heterodimer وهي التي تنتج من ازدواج جزيئات بوادىء مختلفة اذ ترتبط النهاية '3 الباديء مع الطرف '5 لباديء آخر لينتج جزيئات تتنافس مع تضخيم الأهداف مؤدية الى إعطاء مخرجات او حاصل قليل او ظهور المسحات وذلك لتأثيرها في عمليات

الالتحام وبالتالي التضخيم ، كما انها تقلل من جاهزية البوادىء للتفاعلات . وفي حالة RT-PCR فانها تؤثر في تحديد الكميات ، وفي التقنية الأخيرة يمكن الكشف عنها باستعمال او تحليل منحنيات الانصهار .



شكل 20 : آليات تكون مزدوجات البوادىء

أسباب تكوين المزدوجات

يتبين مما ذكر أعلاه ، ان التكامل بين تواليات البوادىء المختلفة تكون السبب الرئيس وراء تكوين المزدوجات ، وهذه تظهر بشكل أوضح عندما يكون محتوى التوالي عاليا من GC وهذا يؤدي ليس فقط الى تشجيع تكوين المزدوجات وانما ارتباط البوادىء الى مناطق غير متخصصة وكذلك تكوين ماشات الشعر Hairpins .

أنواع المزدوجات والطاقة

كما ذكر أعلاه ان المزدوجات قد تكون متجانسة او متباينة ولكل نوع من أنواع المزدوجات طاقة يمكن تحملها والتغاضي عنها . فالطاقة الحرة Δ G التي يمكن تحملها بالنسبة Self dimer عند النهاية '3 اي الخارجي هي :

$$\Delta G = - 5 \text{ kcal/mol}$$

وللمزدوج الداخلي Internal self dimer تكون :

$$\Delta G = - 6 \text{ kcal/mol}$$

اما للمزدوجات بين البوادىء Cross dimers والتي تنشا من البوادىء المختلفة (اي البادىء الأيسر والبادىء الأيمن) Sense end Antisense primers وعند تكاملها تكون الطاقة الحرة Δ G للطرف '3 (الخارجية او الطرفية) هي:

$$\Delta G = - 5 \text{ kcal/mol}$$

وللمزدوجات في المواقع الداخلية :

$$\Delta G = - 6 \text{ kcal/mol}$$

وتلحق بها تكوين ماشات الشعر Hairpins وهي الأخرى تقلل من النواتج . ولكن تكون مضرة ماشات الشعر معتمدة على علاقتها بالطاقة وكذلك الدرجات الحرارية التي تتكون عندها . فالماشات التي تتكون تحت درجة 50°م تكون مشكلة كبيرة . ويظهر الشكل التالي (شكل 21) صور لتركيب المزدوجات وماشات الشعر .

```
4 bp, delta G = -6.6 kc/m (bad!) (worst= -36.6)
        5' GGGAAAATTCCAGGATCTAT 3'
              ||||  ||||
3' TATCTAGGACCTTAAAAGGG 5'

4 bp, delta G = -5.4 kc/m (bad!) (worst= -36.6)
      5' GGGAAAATTCCAGGATCTAT 3'
              ||||
3' TATCTAGGACCTTAAAAGGG 5'
```

مزدوجات البوادىء

```
Oligo, 3 bp (Loop=4), delta G = -0.1 kc/m

        5'  GGGAAA┐
                |||  |
3'  TATCTAGGACCTTA┘

Oligo, 2 bp (Loop=3), delta G = 2.1 kc/m

         5'  GGGAA┐
                || |  A
3'  TATCTAGGACCTTA┘
```

بعض ماشات الشعر

شكل 21 : ماشات الشعر Hairpins ومزدوجات البوادىء

ماشات الشعر تنتج من التداخل داخل جزيئة البادىء Intramolecular interactions . وقد تكون الماشات داخلية او خارجية . وقيم الطاقة Δ G للماشات الخارجية المتحملة 2 Kcal/mol– اما الداخلية Δ G ‎-3 Kcal/mol .

وتمثل G (Gibbs free energy) مقياس لكمية الشغل الذي يمكن الحصول عليه من عملية ما تتم تحت ضغط ثابت ، ولذا فهي تمثل عفوية وتلقائية التفاعل . ولذلك فثبوت ماشات الشعر يمثل بقيم Δ G (التي تمثل الطاقة اللازمة لكسر ماشة الشعر) فالقيم السالبة العالية تشير الى ثبوت التركيب وان ماشة الشعر غير مرغوب فيها ، ووجودها عند الطرف `3 يؤثر في التفاعل بشكل مضر . ويمكن حسابها بالمعادلة :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

المعالجات

بعض مشاكل المزدوجات وماشات الشعر يمكن الكشف عنها نظريا بدراسات الحاسوب ومعالجة الوضع قبل البدء العملي . والبرامج التي تتعامل مع البواديء وتصميمها (كما سيأتي ذكره لاحقا) تبحث عن التكامل الذي يمكن ان يؤدي الى التراكيب الثانوية وغيرها ، ثم تدخل حسابات الطاقة في عملية الاختيار فضلا ان بعضها وهي الجيدة جدا والمتطورة تبحث في قواعد البيانات تلمسا للتشابه والتخصص .

اما من الناحية العملية فيمكن النظر الى السوابق واللواحق لاتخاذ الإجراء الصحيح وأمثلة الظروف الفيزياوية – الكيماوية لنظام التفاعل :

- يمكن ان تتكون المزدوجات عند إعداد خليط التفاعل بدرجة حرارة الغرفة ، وعندها تخلط المكونات ما عدا إنزيم الكوثرة ، ثم يتم مسخ النموذج لمدة 3 –7 دقائق ثم يحفظ على الثلج لمدة 2 دقيقة ثم يضاف الإنزيم لبدء التفاعل . او تستعمل طريقة البدء الساخنة .

والسبب في استعمال طرق البدء الساخنة يعود الى ان البواديء يتم اختيارها ذات تكاملية واطئة فيما بينها ، ولذلك فمن المحتمل انها تلتحم مع بعضها عند درجات حرارية واطئة مثل عند إعداد التفاعل بدرجة حرارة الغرفة نظرا لامتلاك إنزيم الكوثرة لبعض الفعالية عند الدرجات الواطئة والتي يمكن ان تؤدي الى تكوين بعض النواتج من البواديء .

وتم استخدام عدة طرق لمنع تكون المزدوجات الى حين وصول درجات الحرارة الى 60 –70°م ومنها :

- تثبيط إنزيم الكوثرة عند المراحل الأولى ، عمل فصل فيزياوي لمكونات التفاعل الى ان تصل درجات الحرارة الى درجات عالية مثل استعمال الشمع لعزل الإنزيم .
- استعمال تراكيز قليلة من البواديء .
- إجراء عملية التفاعل بدون Formamide اذا كان مستعملا في التفاعل وإمكانية إضافة DMSO الى حد 5٪ .
- استعمال تراكيز مختلفة من كلوريد المغنسيوم مثل 1.5، 2 ، 2.5 ، 3 ملي مول . او الإبطاء من إطلاق ايونات المغنسيوم التي تكون ضرورية لفعالية إنزيم الكوثرة ، ولذلك

يعزل الأخير كيماويا من التفاعل وذلك بربطه بمركبات كيماوية بآصرة تساهمية الى السلسلة الجانبية من الحوامض الامينية في الموقع الفعال ينطلق منها الى التفاعل عند درجات حرارية عالية اي عند التسخين بدرجة 95°م لمدة 5 –10 دقائق او استعمال إنزيم حساس للبرودة اي يكون إنزيم محور لا فعالية له عند الحرارة الواطئة .

- زيادة تركيز قالب DNA
- إيجاد درجة حرارة الالتحام الملائمة باستعمال طريقة الهبوط الحراري.
- تغير تراكيز النيوكليوتيدات.
- تغير القوة الأيونية Ionic strength لنظام التفاعل .

وفضلا عما ذكر أعلاه حول الإنزيم ومحاولة الحؤول بينه وبين حدوث التفاعل خاصة في الأوقات المبكرة من خلط المواد ، هناك إمكانية ربط بعض المثبطات بطرق لا تساهمية ، ومن هذه المثبطات بعض الببتيدات او الأجسام المضادة او Aptamer وعند الدرجات الحرارية الواطئة تثبط فعاليته ، وبعد الحضن لمدة 1 – 5 دقائق بدرجة حرارة 95° م ينطلق او يمسخ المثبط ويبدأ التفاعل (كما ورد آنفا) . ومعظم الظروف والمعالجات أعلاه وان كانت تساعد في التخلص من مزدوجات البواديء الا انها في الوقت نفسه تؤثر في تفاعل الكوثرة الأصلي وتؤثر في كفاءته ، وللتغلب على مثل هذا التأثير يمكن إتباع وسائل أخرى أهمها الاهتمام بتصميم البواديء وإعادة تصميم بواديء أخرى جديدة ، او استعمال إنزيمات كوثرة أخرى او استعمال محاليل تفاعل أخرى .

سابعا : ظهور حزم باهتة Faint bands

تعد من المشاكل المهمة في عمليات إظهار نواتج التفاعل ، وتكون لها أسباب عدة منها :

- كمية DNA المستهدف قليلة وكذلك كمية نموذج الواسمات الوزنية يكون قليلا والأخيرة يجب ان تكون كمياته بين 0.1 – 0.2 مايكروغرام /ملمتر من عرض المسار Lane.
- قد يكون التصبيغ غير متجانس ، وتركيز البروميد يجب ان يكون بحدود 0.5 مايكروغرام /مللتر . واذا كان الهدف المضخم سوف لا يستخدم في الكلونة فيفضل إضافة البروميد الى الهلام عند التحضير وكذلك الى داريء الترحيل .

وعند التصبيغ يجب ان يؤخذ بنظر الاعتبار ظروف الترحيل فعند استعمال ظروف الترحيل القاعدي Alkaline agarose gel electrophoresis يغمر الهلام لمدة 30 دقيقة في كمية كافية من داريء Tris-HCl برقم هيدروجيني 7.5 ثم يصبغ بمحلول

البروميد (0.5 مايكرو غرام / مللتر) لمدة 30 دقيقة . اما عند استعمال هلام الاكريلاميد بوجود اليوريا فينقع الهلام لمدة حوالي 15 دقيقة في داريء البورات (1X) TBE لإزالة اليوريا ، ثم يصبغ في الداريء نفسه الحاوي على البروميد لمدة 15 دقيقة والتأكد من ان كل الهلام مغمور في محلول الصبغة .

- السبب الآخر هو خروج النماذج خارج الهلام ويكون ذلك ناجًا من الترحيل الطويل لذلك يتم إيقاف الترحيل عند وصول الصبغة الدالة الى ثلثي طول الهلام في حالة استعمال Bromophenol blue والى مسافة أربعة أخماس الطول في حالة Orange G ، مع التأكد ان الهلام مغمور تماما بالداريء طول مدة الترحيل ، وان وعاء الترحيل بوضع أفقي تماما .
- المشكلة الأخرى هو انتشار DNA في الهلام وهذا الآخر له أسباب ومنها تجنب الترحيل لمدة أطول من المقرر ، تجنب التصبيغ الزائد لان هذه تؤدي الى انتشار قطع DNA الصغيرة .
- ومن المسببات الأخرى لظهور الحزم بلون باهت هو خزن الهلام بعد انتهاء الترحيل قبل التصوير ، لان هذه العملية تساعد في انتشار قطع DNA الصغيرة .
- قد يحصل إخفاء Masking لحزم DNA بالصبغة المستعملة لتقفي سير النموذج او الواسمات الوزنية ، لذلك لا تستعمل بكميات كبيرة او استعمال محاليل صبغة خاصة لا تؤثر في DNA تحت الأشعة فوق البنفسجية .

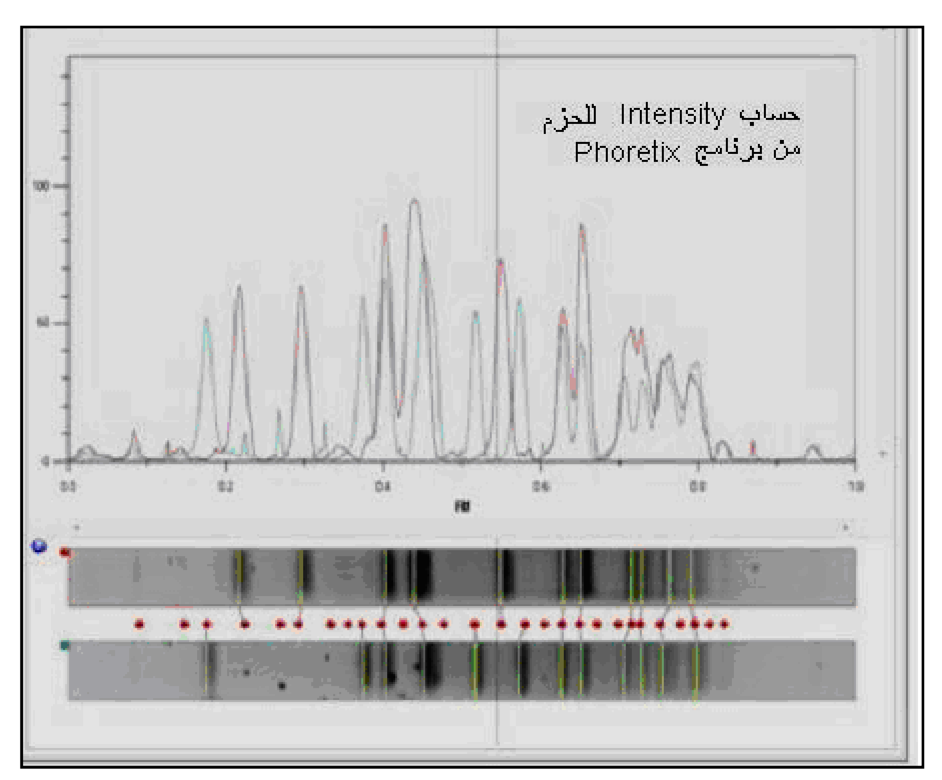
ثامنا : مشاكل أخرى

فضلا عما ذكر أعلاه من المشاكل العامة قد تظهر بعض المشاكل ولكن ليس بشكل متكرر ومنها :

☒ **الخطأ في التقدير الكمي** : تفاعلات الكوثرة وان كان أساسها التقدير النوعي دون التقدير الكمي ولكن بعض الأحيان يمكن إجراء التقدير الكمي التقريبي . والأخيرة قد تواجه بعض المشاكل ويكون ذلك لبعض الأسباب ومنها :

- ❖ اختلاف حجم النموذج عن حجم الواسمات الوزنية التي تتخذ أساسا في التقدير ، لذلك يجب استعمال داريء التحميل نفسه لكل من النموذج والواسمات وكذلك استعمال الحجم نفسه عند التحميل . ويعدل تركيز النموذج الى حجم اقرب حزمة من الواسمات الوزنية ، واذا احتاجت العملية الى تخفيف فيكون باستعمال داريء صبغة التحميل .
- ❖ قد يكون السبب عدم استعمال واسمات وزنية ملائمة لمقارنة حجم جزيئات النموذج .

❖ استعمال طريقة خاطئة في تحديد الكميات ، لذلك يفضل استعمال طريقة Densitometry وطرح خلفية الهلام بدلا من استعمال التقدير الظاهري العيني لمقارنة حجوم الحزم كما في الشكل 22 .



شكل 22 : استعمال طرق Densitometry لتحديد الحزم .

❖ يمكن ان يكون السبب هو التصبيغ غير المتجانس ، كما ان الخلفية المصبوغة بشكل كبير يمكن ان تؤثر في تحديد الكميات ، لذلك يتم التأكد من غمر الهلام في محلول التصبيغ بشكل جيد أثناء عملية التصبيغ بالبروميد او استعمال صبغة SYBR® Green I ، ولا تستعمل تراكيز الصبغات أكثر من التراكيز الموصى بها ، ويجب تجنب إطالة مدة التصبيغ أكثر من 30 دقيقة لان ذلك يزيد من تلون الخلفية .
وفي حالة الرغبة بتصبيغ الهلام أثناء عملية الترحيل فيجب استعمال الصبغة في الهلام وداريء الترحيل وإلا سيكون التصبيغ غير متجانس .
❖ في حالة استعمال الهلام القاعدي أثناء الترحيل يتم تعديل الرقم الهيدروجيني بغمر الهلام في داريء Tris – HCl بتركيز 0.5 مولر برقم هيدروجيني 7.5 وبعد ذلك يصبغ بالبروميد لمدة 30 دقيقة . اما في حالة استعمال هلام الاكريلاميد تحت ظروف المسخ مع اليوريا فيفضل إزالة الأخيرة بنقع الهلام في داريء البورات (1X) لمدة 15 دقيقة قبل التصبيغ بالبروميد لمدة 15 دقيقة ، وقد يخفى DNA بالصبغات تحت

الأشعة فوق البنفسجية لذلك لا تزاد الصبغة أكثر من المقرر سواء لحزم DNA او الواسمات الوزنية واغلب الشركات تزود محاليل متوازنة جاهزة للاستعمال وتعطي نتائج جيدة .

☒ **ظهور حزم في مسارات السيطرة السالبة (NTC) :**

وهذه تكون عادة تكون نتيجة التلوث (وقد تم مناقشة بعض جوانبها في موقع آخر) وتنتج من :

- استعمال كواشف ومحاليل ملوثة ، لذلك وجب استعمال وجبات جديدة .
- تلوث الماصات ونهاياتها ، لذلك تستعمل الجديدة وتغير الماصات عند البداية ونهاية التفاعل لضمان عدم التلوث .
- تلوث منطقة العمل ولذا وجب العناية بهذه الجوانب وعزل مناطق العمل عن غيرها .
- تلوث رذاذي أثناء عمليات تحضير خليط التفاعل لذلك يستعمل الخليط الرئيس Master mix للتقليل من الرذاذ واستعمال الماصات ويفضل استعمال نهاية ذات مرشحات Filter tips .
- تغطية كل الكواشف او حفظها في أوعية مغلقة .
- استعمال الكفوف وتغيرها باستمرار وقد يكون التلوث من تفاعلات قديمة وقد مر ذكر بعض المعالجات لهذه الحالة .

☒ **ظهور مسحات DNA**

سبق ان تم التطرق الى بعض جوانب هذه المشكلة في موضع آخر ولكن لا باس من ذكر بعض الملاحظات الإضافية . فالمشكلة هنا تكون ناتجة عن احد الأسباب الآتية :

- تفكك وهضم الحوامض النووية بالإنزيمات القاطعة ، لذا يجب التأكد من خلو كل مكونات التفاعل من التلوث بهذه الإنزيمات واستعمال داريء جديد وهلام جديد وأدوات خالية من هذه الإنزيمات .
- قد تكون ظروف الترحيل السيئة هي السبب لذا الانتباه الى عملية تحضير الهلام واستعمال الداريء نفسه في كل من عملية تحضير الهلام والترحيل . والتأكد من ان كل الهلام مغمور في الداريء أثناء عملية الترحيل .
- عدم استعمال فولتية عالية وضمن الحدود ، وللحصول على وضوح أكثر تستعمل فولتية واطئة في الدقائق الأولى ثم ترفع الى الحدود العادية ، وعند استعمال الترحيل السريع والفولتية العالية لابد من إجراء تغييرات في مكونات التفاعل .

والفولتية الواطئة وإطالة مدة الترحيل تؤدي الى انتشار الحزم وتكوين المسحات أثناء الترحيل .

بقاء DNA في الهلام

يحصل ان يبقى النموذج في حفر الهلام ولا يتحرك بتطبيق المجال الكهربائي وهذه يمكن ان تكون نتيجة :

- عدم تكون الحفر بشكل جيد او بشكل مائل لذا يتم التأكد من ان المشط يكون عموديا على الهلام أثناء الصب ويزال المشط قبل اكتمال عملية تكوين الهلام التامة ، لذلك يترك للتصلب الكامل ثم يسحب المشط ويغمر الهلام بالداريء مباشرة . وفي حالات خاصة مثل استعمال الاكريلاميد وبوجود اليوريا تغسل الحفر جيدا لإزالتها .
- يمكن ان يكون السبب زيادة كمية DNA المستعمل ، فيستعمل 0.1 – 0.2 مايكروغرام لكل 1 ملم من عرض المسار والأفضل استعمال كميات متشابهة من النماذج وكذلك الواسمات الوزنية .
- التأكد من ان النموذج المراد ترحيله لا يحوي على الرواسب .
- وجود البروتينات المرتبطة بجزيئات DNA مثل إنزيمات اللحم او إنزيمات القطع تؤثر في حركته (Gel shift effect) ويمكن ان تسبب بقاء DNA في الحفر . لذلك تعامل النماذج بمحلول 1٪ من SDS بدرجة حرارة 65°م لمدة 10 دقائق ثم تبرد على الثلج . ويفصل DNA منها بالطرق العادية ثم تحمل على الهلام . وهذه المعاملة تساعد ايضا في التخلص من النهايات اللاصقة التي تؤدي الى ارتباط جزيئات DNA مكونة جزيئات كبيرة جدا لا يمكنها التحرك في الهلام .
- التراكيز الملحية العالية في النماذج تؤدي الى إعطاء نمط حزم منحرفة او مسحات ، لذلك تعالج بالترسيب والغسل بالكحول الاثيلي او تفصل جزيئات DNA عن الأملاح باستعمال أعمدة الفصل ، ثم التعليق في داريء TE .

توقف التفاعل

يحصل بعض الأحيان ان يتوقف التفاعل وذلك يكون ناجا عن استعمال عمليات تدوير مختلفة الظروف . لذا يستعمل الجهاز نفسه لعمليات الأمثلة ، ولا تستعمل أجهزة مختلفة لانها يمكن ان تشذ في السرع ودرجات الحرارة على الأقل في المحاولات الأولية لتصحيح الموقف .

او قد يكون السبب تلف وتفكك dNTPs وهذه تكون حساسة لعمليات التجميد والانصهار ، لذلك تبدل بمحاليل جديدة . وقد تكون الأسباب خطا في عمليات الإعداد ،

لذلك يتم التأكد من جودة المحاليل وصحة إضافتها وعند استعمال محاليل جديدة او وجبة جديدة من البادىء يجب بداية التأكد من صلاحيتها واستعمال برنامج تدوير حراري صحيح وملائم .

قد يكون سبب عدم حصول التفاعل هو وجود المثبطات في نماذج DNA وهذه تعالج باستعمال نماذج مخففة ، او تجري عملية تنقية لجزيئات DNA القالب قبل استعماله .

☒ مشاكل ما بعد الكوثرة

هذه المشاكل تحصل عندما تستعمل نواتج تفاعل الكوثرة لدراسات لاحقة مثل الكلونة او تحديد التواليات ، وقد تكون أسبابها :

- انخفاض دقة الإنزيمات المستعملة ، ولذلك فعند الكلونة او استعمال تفاعل PCR لإجراء عمليات التطفير الموجه Site–directed mutagenesis يفضل لاستعمال إنزيمات قليلة الأخطاء مثل Pfu او خليط من الإنزيمات قليلة الأخطاء .
- الاهتمام بتركيز نموذج DNA والتي تكون (كما ذكر في مواقع أخرى) بالنسبة للـ DNA البلازميدي 0.01 – 1 نانوغرام لخليط تفاعل بحجم 50 مايكرولتر اما gDNAفيكون 0.1 – 1 مايكروغرام /50 مايكرولتر حجم خليط التفاعل.
- قد تكون ظروف التفاعل غير مثالية ، فمثلا عند استعمال إنزيم Pfu يكون الأفضل البدء بتركيز أملاح المغنسيوم $MgSO_4$ 2 ملي مول ، وللخليط من الإنزيمات 1.5 ملي مول من $MgCl_2$.
- عدم توازن مكونات dNTP فكل النيوكليوتيدات يجب ان تكون بتراكيز متساوية والا يحصل خطا في تفاعل الكوثرة ، كما ان التساوي والتوازن في نسب النيوكليوتيدات يزيد من الحاصل .
- مصدر الأشعة فوق البنفسجية ، وهنا تستعمل الأطوال الموجية 360 نانومتر عند قطع الحزم ، وعند استعمال الموجات الأقصر 254 –312 نانومتر فعندها يجب تقصير تعريض النواتج او الحزم عند قطعها الى مستوى الثواني من الزمن .
- عندما يراد التأكد من ان عملية تحديد التوالي صحيحة يتم تحديد توالي الشريطين لزيادة صحة تحديد التواليات .
- عند تصميم بوادىء لقوالبRNA يجب التأكد ان البوادىء تلاؤم الحدود بين الانترون والاكسون حتى يتم التخلص من تضخيم gDNA وذلك بإزالته باستعمال DNase I الخالي من RNases . وفي حالة ظهور حزم إضافية قد تشير الى التلوث بجزيئات gDNA لذلك تهضم بـ DNase I قبل البدء بالنسخ العكسي .

استعمالات تفاعل الكوثرة

تعد تفاعلات الكوثرة الانجاز الأهم الذي أسفر عن الجهود المبذولة في القرن العشرين في مجال البايولوجي الجزيئي وهي تقنية انتشرت بسرعة لكونها سريعة نسبيا وبسيطة الى حدٍ ما وذات مرونة في اختيار القطع المراد تضخيمها ، ويمكن ان تستعمل مدى واسع من مصادر DNA سواء كانت نقية او غير نقية ومن مصادر مختلفة وكذلك مصادر DNA متحللة بشكل كبير او مدفونة في محيط يصعب استخلاص DNA منه ، لذلك أصبحت شائعة ومتداولة للعديد من التطبيقات و كذلك ملائمة للدراسات الجزيئية في مجال دراسة أصول الإنسان Anthropology ودراسة علم أشكال الحياة Paleontology ومن المواصفات الأخرى للتفاعلات انها طريقة سريعة وغير مكلفة لإنتاج عدد كبير من النسخ من كميات صغيرة جدا حتى وان كانت النماذج ذات نوعية رديئة ، ولهذه الأسباب وغيرها وجدت التقنية استعمالات وتطبيقات كثيرة يذكر منها :

- تنميط جزيئات DNA typing DNA
- الكشف عن الأحياء المجهرية في حالة الإصابة ، وإصابة الفيروسات بسرعة حتى قبل ظهور الأعراض وتحديد الحمل الفيروسي Viral load كما في استعمال طريقة qPCR .
- تسهل عملية إجراء التطفير الموجه PCR mutagenesis وهذه الطريقة تستعمل في التعرف على وظائف المهدات Promoters . ويمكن عمل الطفرات أثناء تفاعلات الكوثرة بعدة طرق منها :
- التطفير العشوائي ويكون بالاعتماد على استعمال إنزيمات كوثرة تنتج أخطاء مثل تلك التي تنقصها خاصية التصحيح 3'-5' Exonuclease activity وبهذه الطريقة يمكن الحصول على طفرات عشوائية في نواتج التضخيم . واختيار الإنزيم يعتمد على الغرض من إجراء تفاعل الكوثرة ويوجد الآن الكثير من الإنزيمات المسوقة تجاريا التي تختلف في ثبوتها للحرارة وعملياتها التفاعلية Processivity ودقتها ، وأكثر الإنزيمات التي درست في هذا المجال هو إنزيم Taq .
- ويمكن التلاعب بمكونات الخليط مثل استبدال ايون المغنسيوم بالمنغنيز Mn^{++} الذي يزيد من أخطاء بعض إنزيمات الكوثرة .
- تشخيص الأمراض الوراثية قبل الولادة وتحديد جنس المولود وتحليل الترابط الوراثي باستعمال النطف المفردة .
- دراسة تغايرات تردد الأليلات .

- تسهيل عملية الكلونة باستعمال نواتج التفاعل والتي يمكن ان تتم على مدى زمني قصير مقارنة بالكلونة التي تتم باستعمال الخلايا التي تتم على مدى أسابيع .
- تستعمل في المجال الجنائي وإيجاد البصمة الوراثية DNA fingerprinting والتي تكون الأدلة فيها بتراكيز قليلة مثل شعرة او سوائل جسمية مثل الدم ، المني .
- تضخيم قطع من الجينوم البشري للمساعدة في وضع خريطة للجينوم البشري وغيره من الأحياء .
- كشف وتحديد الطفرات في الإنسان وغيره من الأحياء ، مثل طفرات الحذف او الإقحام وذلك من معرفة الفرق في النواتج .
- متابعة علاج السرطان .
- دراسة التطور الجزيئي Molecular phylogeny .
- تسمح الطريقة بدراسة الأحياء المجهرية غير القابلة للزرع او التي تحتاج وقت طويل للنمو .
- تحديد الجينات الميكروبية المسؤلة عن الامراضية ومقاومة المضادات الحيوية .
- تستعمل في تحليل النماذج الأثرية Ancient DNA لغرض دراسة العلاقات التطورية ومعرفة تطور الأحياء وذلك بمقارنتها بالنماذج الأثرية المتوفرة من حقول دراسية أخرى .
- مكنت الطريقة من تحليل جزيئات DNA من الشرائح المجهرية لأنسجة محفوظة لعدة سنين .
- المساعدة في تحديد تواليات جزيئات DNA بعد إنتاج كميات كبيرة منه من نماذج قليلة .
- عزل الجينات من نماذج الأنسجة .
- بناء المجسات لأغراض مختلفة .
- إمكانية تحديد مواقع القطع بالإنزيمات في نماذج DNA .

محددات استعمال تفاعل الكوثرة

بالرغم من العديد من المواصفات الايجابية التي تتصف بها تفاعلات الكوثرة والتي أهلتها للعديد من الاستعمالات الا ان هناك بعض المزايا التي تحد من استعمالها ومنها :

- التفاعل حساس جدا ، ولذلك فإنه يكون عرضة للتلوث من مصادر DNA الموجودة في بيئة المختبر مثل البكتريا والفيروسات لذلك احتاجت أماكن العمل ان تكون محمية من التلوث وكذلك الماصات والأدوات المستعملة .

• كفاءة إنزيمات الكوثرة المستعملة ، فقد تكون كفاءة الإنزيم عالية لإطالة قطع تصل الى 2–3 كيلو قاعدة ولكن عند استعمال القطع الأطول تقل كفاءة الإنزيم وتزداد أخطائه بزيادة طول القطع وان كانت إضافة كميات جديدة من الإنزيم تساعد في تجاوز هذه العقبة وتلافي قصر العمر النصفي للإنزيمات ، وعلى العموم فان هذه المعالجة قد لا تفيد في حالة الحاجة الى عملية كوثرة دقيقة . وعليه فان تضخيم القطع الكبيرة يحتاج الى إجراء الكوثرة باستعمال خليط من الإنزيمات واستعمال درجات حرارية منخفضة عن المألوف وتسخين بطيء وغيرها من الإجراءات المعتادة .

• المحاليل والمواد والأجهزة تكون كلفتها مناسبة نسبيا لكنها تبقى فوق قابلية المختبرات الصغيرة .

• تصميم البوادئ يعيق انسيابية استعمال التقنية في مجالات عدة فالعملية في معظم الجوانب تحتاج الى معرفة كبيرة بالتوالي المطلوب تضخيمه ، لذلك حورت الطريقة في بعض الأحيان لتجاوز هذه العقبة . فالبوادئ المصممة يمكن ان ترتبط الى بعضها مكونة مزدوجات البوادئ ، او ترتبط الى أماكن غير متخصصة وبالتالي تؤدي الى نواتج غير متوقعة بتضخيمها أهداف غير مطلوبة او إعطاء حاصل قليل ، وقد مر ذكر بعض هذه المشاكل مسبقا .

• قد تبرز بعض المشاكل عند إجراء الدراسات على النواتج بعد التضخيم خاصة في مجال تحديد التواليات ، والأخيرة نادرا ما تكون ناجحة ما لم يتم التعرف على كيفية إنجاحها مثل :

  - إعادة تقطيع النواتج بالإنزيمات القاطعة لمعرفة فيما اذا كانت النواتج هي المطلوبة
  - معرفة حجم او وزن جزيئات النواتج على الهلام قبل البدء بعملية تحديد التوالي .
  - التأكد من عدم وجود حزم غير متخصصة من النواتج بواسطة الهلام اذ نادرا ما ينتج التفاعل حزمة واحدة وإنما تكون هناك حزم أخرى لا يمكن رؤيتها تؤثر في تحديد التواليات ، وفي هذه الحالة ينفع استعمال تفاعل كوثرة العنقدة للتقليل من هذه المشاكل اذ انه من المستبعد ان تضخم قطع غير مطلوبة بعد استعمال بوادئ داخلية في الخطوة الثانية من كوثرة العنقدة .
  - يجب إزالة كل النيوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات منقوصة الأوكسجين dNTPs غير المندمجة والفائض من البوادئ وغيرها بعملية تنظيف ملائمة قبل البدء بعملية تحديد التواليات . ومن الطرق الملائمة هي كلونة القطعة المطلوبة على ناقل ملائم وتكثيرها ثم تنقيتها ثم استعمالها .

- تهيئة نماذج مركزة من جزيئات DNA وهذا يعتمد على طول القطعة فمثلا قطع بحجم 200 قاعدة تحتاج ان تعدل الى تركيز 2 نانوغرام/مايكرولتر ومثل هذه تحتاج أجهزة لقياسها مثل Nanodrop وغيرها من الأجهزة السالف ذكرها .

والمحددات المذكورة وغيرها يمكن ان تؤثر في تطبيقات تقنية تفاعل الكوثرة ، والتي استدعت إجراء عمليات التطوير في السابق والمستقبل .

الأنواع الخاصة من تفاعلات الكوثرة

في تفاعلات الكوثرة العادية يتم الكشف عن نواتج نهاية التفاعل End point products والتي يتم الكشف عنها عادة باستعمال الهلام لفصل القطع المضخمة . ولطريقة الكوثرة العادية عدد من المحددات منها:

- النتائج التي يتم الحصول عليها بعد انتهاء التفاعل تحتاج الى وقت يصل في بعض الحالات الى أيام .
- الطريقة تعتمد على التفريق بين الحجوم التي قد لا تكون مضبوطة جدا .
- تكون النواتج النهائية متغايرة من نموذج الى آخر أي قلة الدقة .
- تكون الحساسية منخفضة والنتائج اقل وضوحا .
- النتائج لا يعبر عنها بالأرقام .
- البروميد المستعمل في التصبيغ لا يعطي نتائج كمية .
- في بعض الأحيان تكون القطع متساوية الحجم لكنها مختلفة التركيب وهذه يصعب التميز بينها .
- لا يمكن للعملية ان تتم بشكل أوتوماتيكي .
- في التحليلات السريرية تكون غير مجدية وتحتاج الى استعمال الجسات والتي بدورها تحتاج الى عناية فائقة لمنع التلوث الذي يحصل من المختبر وغرف تحضير DNA فضلا عن انها تحتاج الى وقت طويل . و لهذه الأسباب وغيرها احتاجت العملية الى تطوير او استعمال نهج آخر ولذلك استعملت طريقة RT-PCR .

الكوثرة الآنية Real-Time PCR (RT-PCR)

تعتمد العملية على الكشف عن النواتج في المراحل المبكرة من عمليات التضخيم أثناء التفاعل ويمكن لهذه الطريقة الكشف عن تغيرات التضاعف في كل ثانية يمر بها التفاعل وحساب كمية جزيئات DNA التي بدأ بها التفاعل استنادا الى عدد الدورات التي مر بها ، في حين ان طريقة الفصل بالهلام تحتاج ان يحصل تغير يصل الى عشرات المرات عن الأصل .

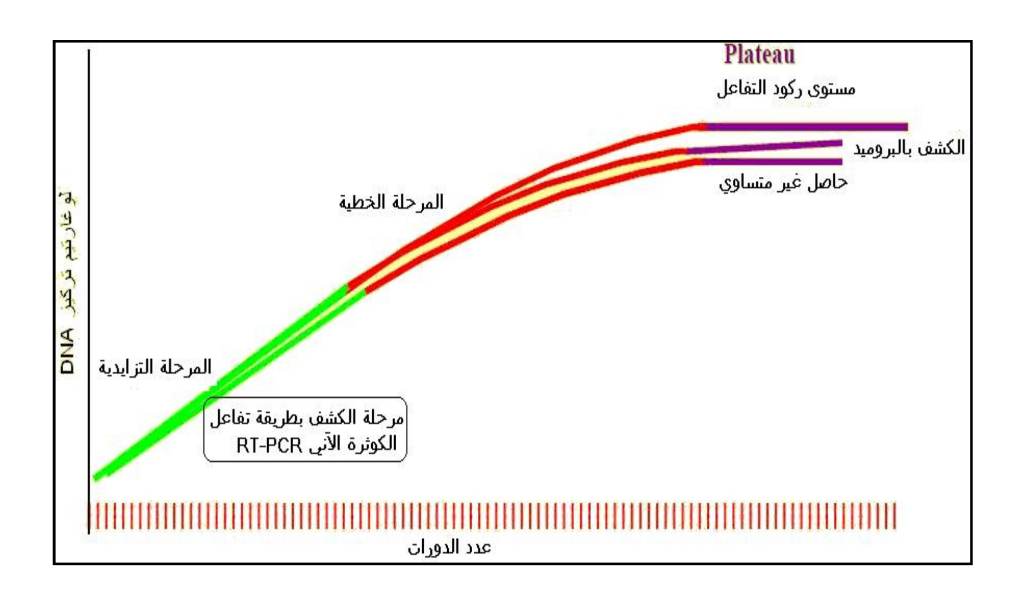
ويكون ذلك في RT-PCR بقياس حركيات التفاعل في الأطوار الأولى من PCR ويزود بمعلومات وفوائد لا توجد في تفاعلات الكوثرة العادية . لذا يكون الاختلاف الرئيس بينهما هو ان RT-PCR تحدد الكميات المبدوء بها وليس النواتج اي انه يحدد الكميات في الوقت الذي تتكون فيه Point in time أثناء عملية التدوير والتضخيم والكشف عنها لأول مرة

، وليس تحديد كميات النواتج كما في تفاعل الكوثرة العادي الذي تتراكم فيه النواتج عند انتهاء التفاعل والتي تشمل عدد كبير من الدورات .

آليات ومراحل تفاعل الكوثرة بطريقة RT-PCR

تعتمد طريقة تسجيل التضاعف في هذه الطريقة على انبعاث التألق لصبغات خاصة وقياسه . في البداية كان يستعمل البروميد الذي يضاف الى خليط التفاعل وبتراكم النواتج يمكن إظهارها عند كل دورة اي ان زيادة قطع DNA سيؤدي الى زيادة التألق وهذا له علاقة مباشرة مع عدد النسخ المبدوء بها ، فعند البدء بعدد كبير من النسخ فان دورات قليلة ستؤدي الى ظهور إشارات التألق التي يمكن الكشف عنها وبذلك يمكن معرفة كفاءة التضخيم تحت الظروف المختلفة .
ولكن البروميد غير متخصص بالارتباط بمزدوجات DNA الحاصلة من الكوثرة فقط فمثلا هو يرتبط بمزدوجات البوادئ التي تشارك في التألق وبالتالي يكون تسجيل الكميات غير صحيح . وبعد المراجعات تم استخدام مجسات وصبغات متفلورة لتسجيل تراكم النواتج التي أدت الى زيادة تخصص طريقة RT-PCR وأدت الى زيادة الدقة في تقدير الكميات . وبالتالي تم تطوير مجالات لجيل جديد من طرق الكوثرة PCR والكواشف والمحاليل الخاصة بها وسمحت بتنظيم و تحديد الكميات بشكل متزامن في كل دورة .
والأساس في الطرق المختلفة استعمال جهاز تدوير حراري مع وسيلة معالجة في الجهاز لغرض الكشف التي يمكن ان تسجل حالات التبريد والتسخين وتسجيل تقدير جزيئات DNA .

وتكون طريقة تفاعل الكوثرة الآني حساسة جدا وتتميز الى أطوار كما هو موضح في الشكل الآتي (شكل 23) :



شكل 23 : مراحل تفاعلات RT-PCR

يوضح الشكل خطوات تفاعل ثلاث مكررات للنموذج نفسه والتي بدأ التفاعل بها بكميات متساوية ويلاحظ عند البدء ان التفاعلات تكون دقيقة ويكون التضاعف تزايدي اذ يتضاعف الهدف في كل دورة وذلك لان ظروف التفاعل ملائمة من حيث تراكيز ووفرة المواد وحركيات التفاعل تدفع كلها الى حالة التضاعف وتكون الكفاءة بحدود 100٪ وتتضاعف في كل دورة وباستمرار التفاعل تقل المكونات نتيجة الاستهلاك ويبدأ التفاعل بالتباطؤ ولا تتضاعف نواتج الكوثرة عند كل دورة كما يلاحظ في المرحلة الخطية من الشكل وتنخفض الكفاءة لعدة أسباب ، مثلا المواد المتضخمة يعاد ارتباطها Reassociation أثناء خطوة الالتحام .

وتبدأ نواتج النماذج (المكررات) بالانفراج في القيم المسجلة ، ثم يبدأ التباطؤ بشكل كبير عند طور الركود Plateau ويقل معدل التخليق الى الصفر ويصل الى حد الركود عند نقاط مختلفة نظرا لاختلاف حركيات التفاعل لكل نموذج . وعند حد الركود تبدأ قياسات تفاعل الكوثرة العادية اي تحديد الكميات عند نهاية التفاعل End point detection . لذا كان من الضروري إجراء القياسات عند الطور ألتزايدي (اي الدورات المبكرة من التفاعل) وهو ما تعتمد عليه طريقة RT-PCR وذلك بتوفيرها وسيلة لقياس تراكم المتضخم الخاص بشكل مستمر أثناء الدورات بالاعتماد على التغير في التألق داخل وعاء التفاعل . ويتم تحليل النواتج دون فتح الأنابيب وبالتالي التخلص من هاجس انتشارها في بيئة المختبر ومنع التلوث وهو الأهم ثم التقليل في الكلفة وبعبارة أخرى فان ذلك يتم بتسجيل التألق الذي ينبعث أثناء عملية الكوثرة والتي تشير الى كمية المواد عند كل دورة و بذا فان الأجهزة الخاصة تمكن من ملاحظة الزيادة أثناء تطور التفاعل اي في الوقت ذاته او الوقت الحقيقي .

ويتضح مما ذكر أعلاه ان تحليل نواتج الكوثرة العادية لا تعطي فكرة عن الكميات وذلك لان النواتج لا تعتمد على تركيز التوالي المستهدف المبدوء به والتي تحور لتعطي اكبر كمية لعمليات الكشف فقط (الى حد ما) في حين في RT-PCR يتم تجاوز هذه المشكلة ، وتكون الأخيرة ملائمة لانها لا تحتاج الى معالجة ومعاملة النواتج بعد انتهاء تفاعل التضخيم لإظهارها باستعمال الجسات وتحليل الانصهار يمكن ان يكشف عن التغاير حتى وان كان بقاعدة واحدة .

طرق إجراء RT-PCR

يعرف تفاعل كوثرة الوقت الحقيقي او تفاعل الكوثرة الآني بمسميات أخرى مثل Kinetic PCR ، qPCR ، qRT-PCR ، RT-qPCR ، وكلها تهدف الى تحديد عدد نسخ قوالب DNA او cDNA المستهدف في تفاعل الكوثرة والتي تعتمد على تسجيل إشارات التألق في تفاعل واحد او اكسر من تفاعلات الكوثرة لكل دورة الى حين اكتمال التفاعل ويمكن ان تستعمل لتحديد الكميات المبدوء بها . وتوجد طريقتان لذلك :

- الطريقة المعتمدة على الجسات Probe-based method
- الطريقة المعتمدة على صبغات الحشرIntercalator dyes – based method

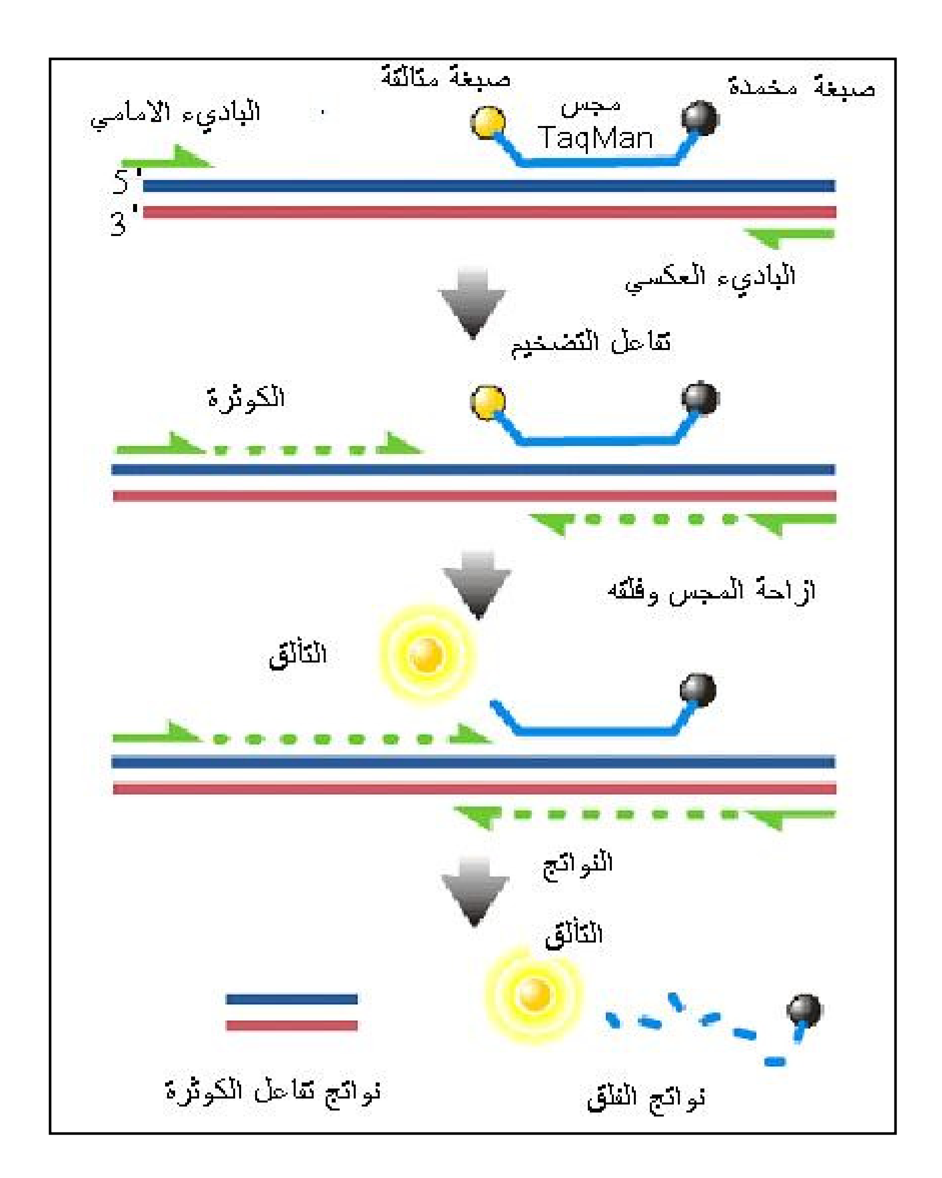
والطريقتان تحتاج دورات حرارية خاصة وكاميرات حساسة لتسجيل التألق في كل حفرة (96 Well plate) عند فترات محددة من تفاعل الكوثرة . وفي الوقت الحاضر توجد أربع تقنيات او طرق كيميائية لانجاز RT-PCR وهي :

- مجسات TaqMan .
- المرشدات الجزيئية Molecular Beacons .
- الجسات العقربية Scorpions .
- السايبر الأخضر SYBR green .

كل هذه الطرق تعتمد في الكشف عن النواتج التي تولد إشارات التألق ، الثلاث الأولى منها تعتمد على حقيقة Fluorescence (Foster) Resonance Energy Transfer (FRET) لإعطاء إشارات التألق بعد وضع صبغة الإعلان او صبغة التألق والصبغة المخمدة Quenching على نيوكليوتيدات قليلة Oligonucleotides تعد المواد الأساس في التفاعل ، اما الطريقة الأخيرة وهي استعمال صبغة SYBR فهي تعطي بعض التألق عندما تكون حرة في المحلول ويزداد تألقها عند ارتباطها بأشرطة DNA المزدوجة التي تزداد عند تفاعل الكوثرة .

• استعمال مجس **TaqMan**

تعتمد الطريقة كما هو موضح بالشكل التالي (شكل 24) على فعالية 5' – Exonuclease activity لإنزيم الكوثرة المستعمل في التفاعل .



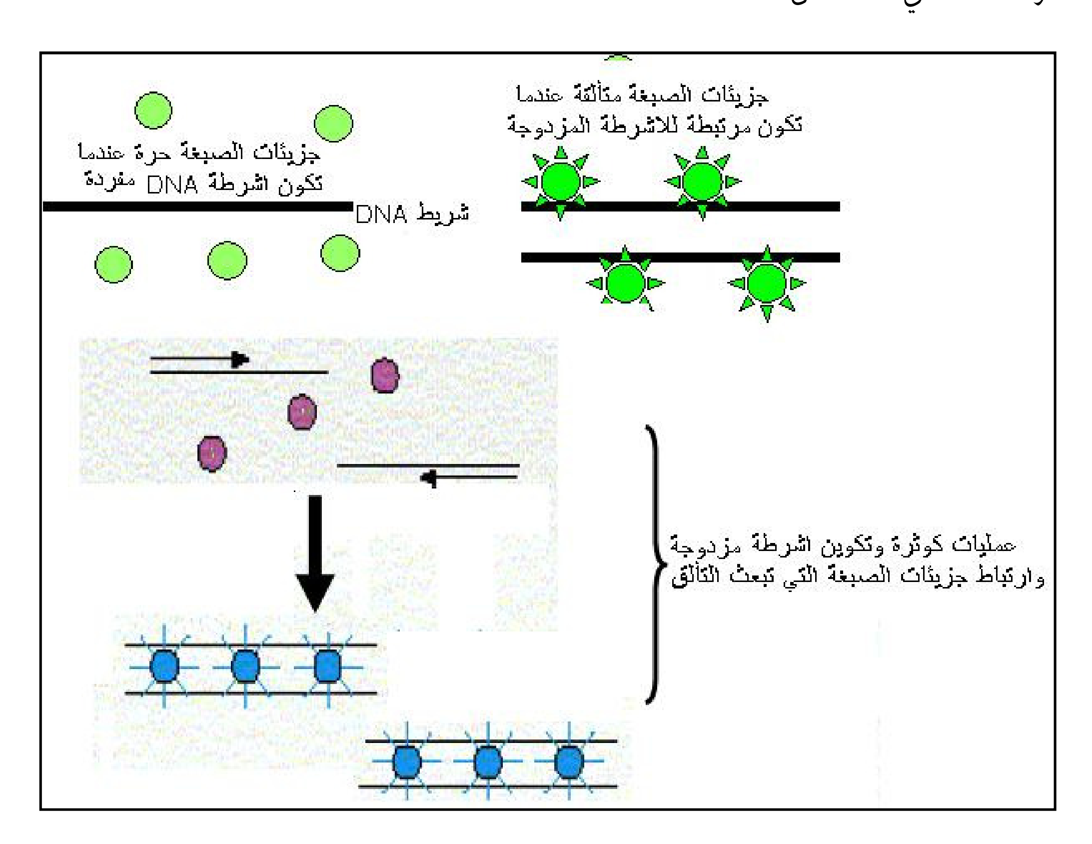
شكل 24 : مجس TaqMan

ويتضح من الشكل ان المجس المكون من عدد قليل من النيوكليوتيدات سيكون مرتبط بالنهاية ' 5 الى صبغة متألقة او ما يسمى بصبغة الإعلان Reporter dye . و في الطرف الثاني '3 مرتبطة بصبغة مخمدة Quenching .

و هذه القطع تكون مصممة بحيث تتكامل وترتبط الى مناطق محددة من DNA المستهدف او نواتج تفاعل الكوثرة . في الحالة الاعتيادية لا تظهر اي إشارة للتألق . وأثناء التفاعل وعندما يقوم إنزيم الكوثرة بمضاعفة الشريط القالب الذي يكون مجس TaqMan مرتبط اليه فان فعالية الإنزيم (5'- 3' Exonuclease) تفلق المجس مما يؤدي الى افتراق او تباعد الصبغة المتألقة عن الصبغة المخمدة وبالتالي ينعدم انتقال الطاقة من الصبغة الأولى الى الثانية اي انعدام FRET . لذلك يزداد التألق في كل دورة اعتمادا على كمية المجس المنفلق . وهذا يعني ان التفاعل يكون متخصصا بالهدف . و مجسات Taq Man المصممة بشكل ملائم وجيد تحتاج الى القليل من التلاعب لتحديد الظروف المثلى (الأمثلة) . ويمكن ان تستعمل في تفاعلات الكوثرة المتعددة Multiplex عند تصميم عدة مجسات Probes كل منها ملائم لهدف واحد من الأهداف . و ما يعيب على الطريقة انها مكلفة .

- **طريقة ساير الأخضر SYBR Green**

الطريقة موضحة في الشكل 25

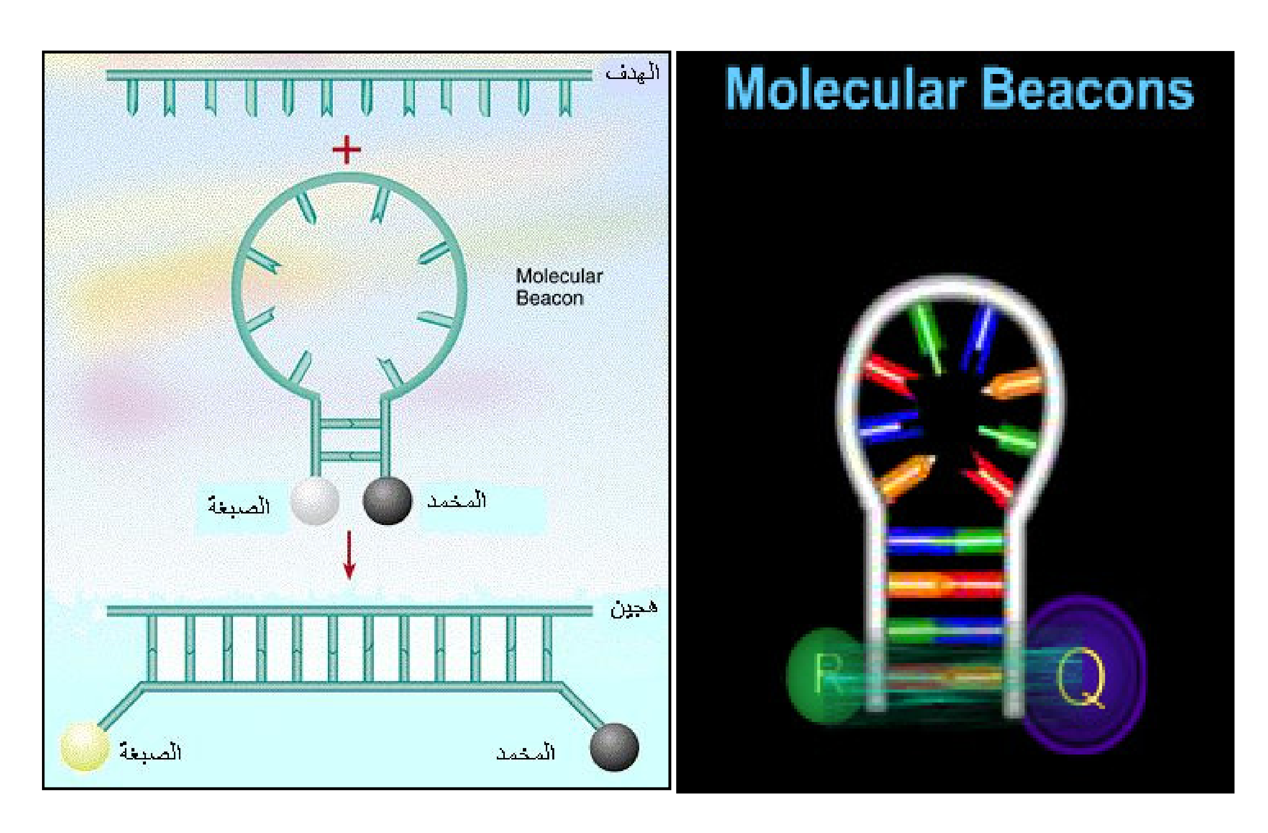


شكل 25 : طريقة ساير الأخضر SYBR Green

توفر الطريقة ابسط الوسائل وأكثرها اقتصادا وحساسية للكشف وتحديد نواتج تفاعل الكوثرة أثناء حدوثها اي في الوقت الحقيقي . وتعتمد الطريقة على ان الصبغة عندما تكون في المحلول لا تعطي تألقا ولكن ترتبط الى أشرطة DNA المزدوجة للأخدود الأصغر (وهي في هذه الحالة نواتج تفاعل الكوثرة) لتعطي تألقا واضحا عند التهيج ، ولذلك بتجمع نواتج التفاعل يزداد التألق .

ومقابل المزايا الحسنة المذكورة أعلاه فان للطريقة مزايا سيئة قد تحول بعض الأحيان دون استعمالها فالصبغة ترتبط الى أشرطة DNA المزدوجة في خليط التفاعل بما فيها مزدوجات البوادئ وكذلك نواتج التفاعل غير المتخصصة مما يؤدي الى حصول زيادة خاطئة في قراءة تركيز DNA المستهدف . لذلك تحتاج الى أمثلة ومتابعة التحليل لتوثيق النتائج . وعلى العموم فانه في تفاعلات الكوثرة الأحادية Monoplex وبتصميم بوادئ جيدة فان الطريقة تعمل بشكل جيد .

• **المرشدات الجزيئية Molecular Beacons** أساسيات الطريقة تشبه استعمال مجسات TaqMan و لكن المجس يصمم على ان يبقى سليما أثناء عمليات التضاعف والتضخيم ثم يرتبط الى الهدف . الطريقة موضحة في الشكل 26 :

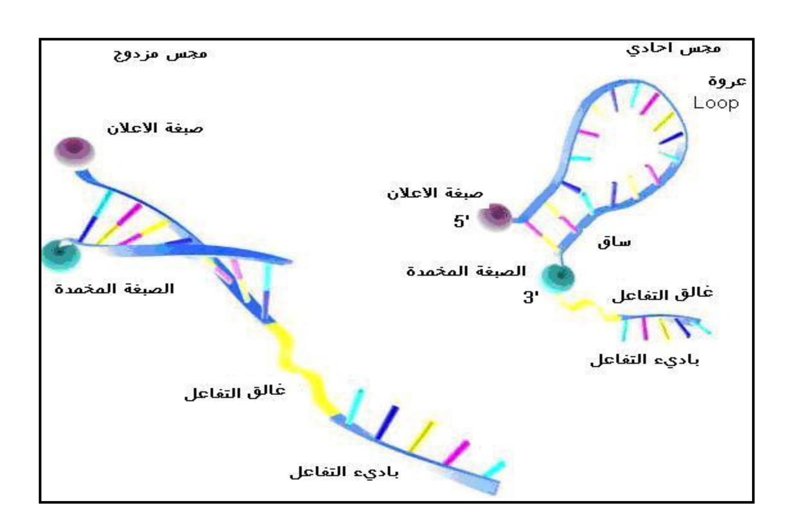


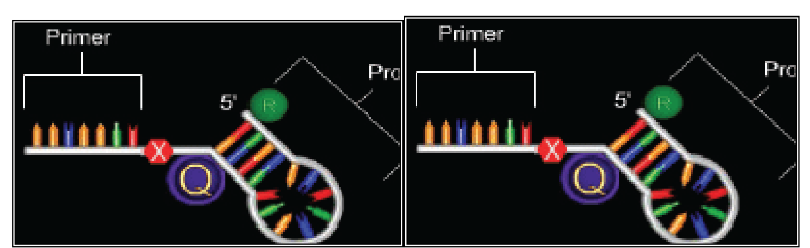
شكل 26 : طريقة المرشدات الجزيئية Molecular Beacons

فالمجس يكون بشكل تركيب يحوي على عروة وساق مزدوج القواعد ، ترتبط صبغة الإعلان الى احد جانبي الساق والصبغة المخمدة الى الثاني وعندما يكون حرا في بيئة او محلول التفاعل فان التقارب بين الصبغتين لا يسمح بحصول تألق (اي حصول FRET) ولكن عندما تتهجن الجزيئة مع أشرطة DNA (الهدف) تبتعد الصبغتان ولا يحصل نقل للطاقة فتطلق صبغة الإعلان التألق الذي يسجل على انه إشارات يمكن قياسها . ويمكن ان تستعمل الكوثرة في تفاعلات الطريقة المتعددة باستعمال قطع مختلفة من المجسات تلاؤم الأهداف الموجودة في محلول تفاعل الكوثرة ، وتكون عملية تصميم مثل هذه المجسات مكلفة في هذه الحالة .

المجسات العقربية Scorpion probes

في هذه الحالة تستعمل مجسات مشابه لما ذكر أعلاه وكما موضح في الشكل 27 :





شكل 27 : المجسات العقربية

وتكون المجسات على شكل عروة وفيها ساق تربط صبغة الإعلان (المتألقة) الى طرف '5 والمخمدة على طرف '3 ، والطرف الأخير يحوي على توالي مكمل لنواتج إطالة البادئ الذي يرتبط الى تواليات متخصصة في البادىء . وبعد إطالة البادئ مع المجس يصبح قادرا على الارتباط مع مكملاته في المتضخم الناتج وهذا يؤدي الى فتح عروة المجس وابتعاد الصبغات عن بعضها وبالتالي يبدأ التألق بعيدا عن فعالية الإخماد وعندها يمكن تسجيل إشارة التألق الناتجة .

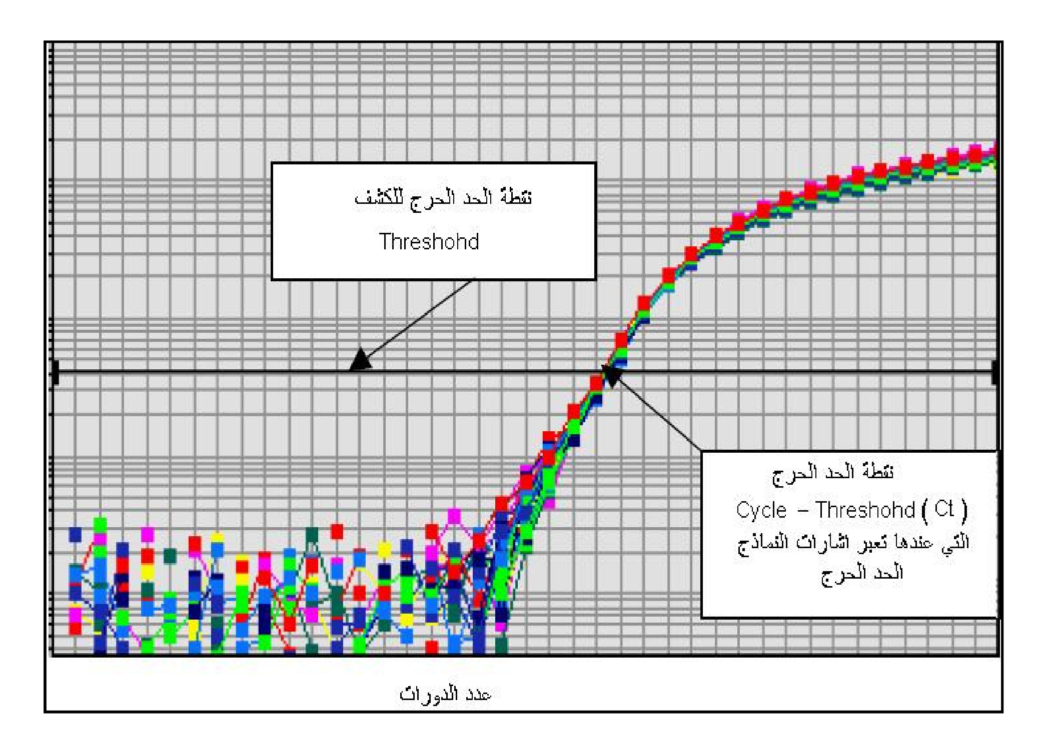
الالتباس بين تفاعل الكوثرة الآني وتفاعل نسخ الكوثرة العكسي

ان طريقة تفاعل الكوثرة العكسي Reverse transcriptase PCR (rt-PCR) هي طريقة غير مباشرة لتضخيم جزيئات mRNA اي تحديد الجينات تحت التعبير وبما ان طريقة تفاعل الكوثرة تقتصر على تضخيم DNA لذا يصار الى تحضير cDNA الأكثر ثبوتا باستعمال إنزيمات النسخ العكسي . وعادة تكون كميات mRNA قليلة جدا لذلك احتاجت الى طرق حساسة لتحديدها مثل Real Time - PCR ومن هنا جاء الالتباس عند البعض . اذ انه من الممكن الحصول على cDNA واستعماله بطرق PCR عادية ولكن الطريقة تكون غير حساسة لعدم إمكان البروميد المستعمل في الخطوات النهائية من الكشف لان حساسية استعمال البروميد تكون محدودة .

مشاكل مزدوجات البوادئ في RT-PCR

طريقة تحديد نواتج التفاعل الحقيقية RT-PCR تعاني هي الأخرى من المشاكل كما هو الحال في طرق التفاعل العادية ومنها تكون مزدوجات البوادئ . وفي الطريقة الأخيرة يعمد الى نتائج الترحيل الكهربائي للكشف عنها . اما في طريقة RT-PCR فان مزدوجات البوادئ والكشف عنها يكون باستعمال وتحليل منحنيات الانصهار كما هو الحال مع استعمال صبغة SYBR Green I القابلة للانحشار في أشرطة DNA المزدوجة .

ونظرا لكون مزدوجات البوادئ قصيرة فهي تمسخ وتنصهر بدرجات حرارة واطئة مقارن بالتواليات المستهدفة التي تكون اطول ، وبالتالي يمكن الكشف عنها وتميزها بالاعتماد على صفاتها من منحنيات الانصهار الموضحة من مخرجات احد البرامج (LightCycler) الذي يستعمل الصبغة المذكورة أعلاه الممثلة في الشكل 28 .



شكل 28 : منحنيات الانصهار

وكما هو الحال بطريقة تفاعل الكوثرة العادية ومشاكل تكون مزدوجات البوادئ ومسبباتها تعالج هنا بالطرق المذكورة سابقا .

طرق تحديد كميات DNA المضخم

عمليات تحديد الكميات بهذه الطريقة تتم بقياس أولا عدد الدورات اللازمة للكشف عن إشارة التألق الى حين الوصول الى الحد الحرج الممكن تسجيلها او تحديد أعلى تألق مقابل عدد الدورات و بذا يكون عدد الدورات متناسبا مع عدد النسخ DNA القالب في النموذج . هناك أكثر من طريقة لتحديد الكميات وهذه تعتمد على التقنية المستعملة في انجاز تفاعل RT-PCR . وهي بصورة عامة :

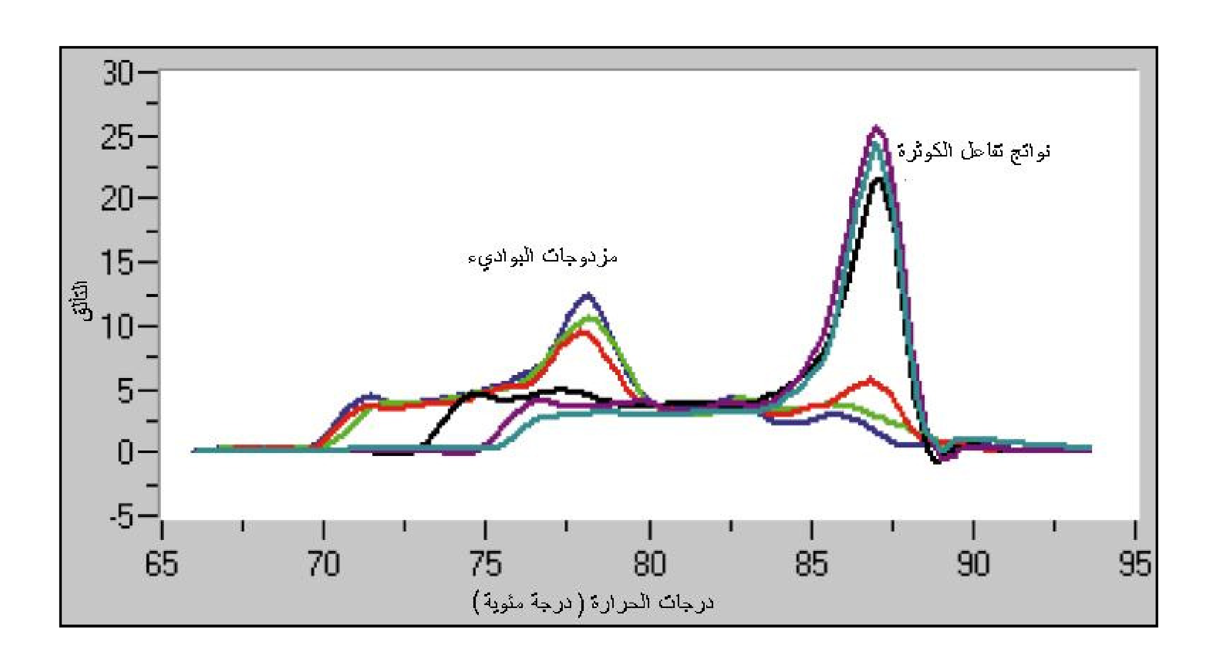
- استعمال منحنيات مرجعية Reference curves التي تحضر من RNA او غيره من الجزيئات بتراكيز محددة وتجري عليها القياسات ، وتستعمل كمرجع لمعرفة كمية جزيئات الهدف غير معروفة التركيز .

يمكن ان تستعمل منحنيات جزيئات RNA الا ان ثبوتها القليل يمكن ان يكون مصدرا للتغاير في النتائج النهائية وخطوات متابعتها تكون مهدرة للوقت وان كانت مفيدة في بعض الأحيان وعند العناية الفائقة بتحضيرها وبكميات دقيقة جدا يمكن ان تساعد في تحديد عدد النسخ والبيانات حولها ، ويمكن استعمال جزيئات أخرى في تحضير المنحنيات المرجعية وهي:

أ- أشرطة مزدوجة dsDNA من البلازميدات النقية .
ب- جزيئات cDNA المحضرة خارج الأنظمة الحية .
ت- أشرطة المفردة ssDNA محضرة خارج الأنظمة الحية .

وتستعمل أجهزة المطياف الضوئي عند طول موجي 260 نانومتر لتحديد تركيز DNA وهذه تحول الى عدد النسخ اعتمادا على الوزن الجزيئي للنموذج المستعمل ويمكن ان تصحح القيم باستعمال جينات الإدامة Housekeeping genes .

- طريقة النقطة الفاصلة Threshold cycle(Ct) وهي النقطة التي يكون فيها التألق المنبعث من النواتج اكبر من الخلفية ويصبح بالإمكان قياسه وهي النقطة المسؤلة عن دقة تقدير الكميات لهذه الطريقة او بطريقة qPCR . كما موضحة كما في الشكل الآتي (شكل 29)



شكل 29 : الكشف عن مزدوجات البوادىء

والطريقة تعتمد على المقارنة لنماذج الدراسة مع منحنيات السيطرة المستعملة فيها نماذج غير معاملة او من RNA من الأنسجة الطبيعية وهناك معادلات خاصة لحسابها وتصحح عادة بالاعتماد على جينات الإدامة .
ومثلما ذكر أعلاه ان هناك طرق أخرى ، وفي جميع الأحوال فان تحديد الكميات يعتمد على الطريقة المستعملة وكذلك طور التفاعل . فالمعروف ان هناك علاقة وثيقة بين الكميات المبدوء بها والكميات المضخمة في كل دورة ، وطريقة RT-PCR تكشف عن

تراكم المواد المتضخمة أثناء التفاعل وتستخرج البيانات أثناءه لذلك يكون الطور ألتزايدي هو الطور الأمثل لتحليل البيانات لان التضخيم في هذا الطور يكون عند الحدود المثالية و خاصة بالنسبة للأهداف الشائعة . اما الأهداف النادرة فهي حتى في هذا الطور تكون تحت إمكانية الكشف عنها . وعمليا فان المدى الحركي او الداينميكي للطريقة يكون بين 2–3 دورات لوغارتمية (2-3 logs) ولزيادة هذا المدى يمكن إعادة التفاعلات وتغير عدد الدورات بحيث يمكن تحليل النماذج كلها في الطور ألتزايدي .

تطبيقات RT-PCR

لهذه الطريقة مزايا جيدة كثيرة لذلك اتسعت مجالات تطبيقها ومن هذه المزايا :

- ان حدوث عمليات التضخيم والكشف عنها يتم في جهاز واحد اذ يتم تسجيل التفاعلات بقياس تألق الصبغات او المجسات .
- وقت التدوير يكون سريع اذ تستغرق دورات من 20 الى 40 دورة في مدة 35 دقيقة في بعض الأجهزة ، وبذا يمكن معالجة والتعامل مع ما يقرب من 200–500 نموذج/ يوم .
- لا يحدث التلوث عادة لان أوعية التفاعل تبقى مغلقة أثناء تسجيل النتائج .
- تكون حساسية الطريقة عالية و تتم بالسرعة الممكنة حتى عند وجود عدد قليل من النسخ مثل 10 نسخ .
- نتائجها قابلة للإعادة وبدون تغيرات كبيرة .
- أمكن دمجها مع تقنيات أخرى مثل ELISA وكذلك أمكن وضع برامج حاسوبية Software لتتعامل مع كل الخطوات وإيجاد الحلول على الحاسوب *In Silico* بداية لتعالج بعد ذلك عمليا .

و كل هذه المزايا مكنت من استعمال التقنية في المجالات التي تستعمل فيها تفاعلات الكوثرة العادية ولكن بدقة وانجاز أفضل منها :

◊ تحديد مدى التعبير الجيني .
◊ تشخيص الأمراض الناجمة عن الإصابة مثل تحديد كميات الفيروسات Viral load
◊ تحديد كفاءة الأدوية .
◊ قياس مدى التدمير الحاصل لجزيئات DNA .
◊ التنميط الجيني .
◊ الفحص الوراثي للإنسان .
◊ مجالات السيطرة النوعية.
◊ تأكيد نتائج المصفوفات Array verifications .

وبصورة عامة فان الطريقة تقيس حركيات تراكم نواتج التفاعل في أنبوب التفاعل ولا يتم تسجيل النواتج في الدورات الأولى من التفاعل وإنما يتم ذلك اذا كانت الإشارات أعلى من الحد الحرج الذي يسجله الجهاز .

الأجهزة المستخدمة

تكون أجهزة RT-PCR بصورة عامة هي أجهزة او مكائن تفاعلات الكوثرة العادية ولكن مدمجة مع وسائل لقياس التألق Fluorometers ووسيلة أخرى لإيصال الضوء المتهيج والناتج في وعاء التفاعل الى وسائل الكشف والقياس وهذه أهم ميزة في أجهزة RT-PCR . وظهور الضوء كما ذكر أعلاه يتم بطريقتين ويعتمد على الصبغة المستعملة وكذلك طريقة التطبيق . فكما ذكر أعلاه ان الصبغة الخضراء SYBR Green I ترتبط الى الأشرطة المزدوجة من DNA (dsDNA) وتعاني عندها من تغيرات شكلية واختلاف في توزيع تركيبها الذي يؤدي الى زيادة التألق .

اما الطريق الثاني FRET وفي هذه الحالة تستعمل عدة طرق لتغير التنسيق النسبي للجزيئات المستلمة والمعطية للفوتونات (الضوء) ، وهذه الجزيئات (الصبغات) ترتبط الى المجسات او البوادئ او نواتج تفاعل الكوثرة ، ويتم انتخاب الصبغات من حيث الأفضلية للحصول على النتائج عند التغير عند طول موجي معين . ومن المتوقع ان تكون هناك جزيئات متفاوتة في الكفاءة . وكما ذكر أعلاه فان إشارات التألق تقتنص من قبل واسطة النقل وتذهب لتظهر على شكل إشارات على الشاشة والذي يجب ان يكون أعلى من الحد الحرج او الخلفية .

وطريقة RT-PCR يجب ان تتم بطرق أوتوماتيكية لان العمل اليدوي يكون مضنيا ، وتحتاج الى منحنيات قياسية ووسائل لحساب عدد النسخ وهذه كلها تتم بشكل آلي في الأجهزة المسوقة في الوقت الحاضر . ومن كل ما ذكر حول الأجهزة وملحقاتها يتبين ان التقنية تحتاج الى مدور حراري ، أجزاء بصرية Optics لتحديد إشارات التألق ، حاسوب وبرامج خاصة للتعامل مع النتائج وتحليلها وتوجد العديد من الشركات التي تزود مثل هذه الأجهزة .

تفاعل الكوثرة الرقمي Digital PCR (dPCR)

تعد طريقة تفاعل الكوثرة الرقمي تحديث لطريقة تفاعل الكوثرة الاعتيادي ويمكن ايضا ان تستعمل مع DNA و cDNA ، وبطريقة غير مباشرة مع RNA ولكن تستعمل لتحديد الكميات مباشرة . ويمكن للطريقة الرقمية التغلب على المشاكل الحاصلة في الطريقة الاعتيادية . وقد كانت هناك أكثر من ضرورة لإيجاد التفاعل الرقمي ، اذ يكون من

الضروري الكشف عن طفرات نادرة وفي مجموعة صغيرة جدا من الخلايا وهذه لا يمكن الكشف عنها بتفاعلات الكوثرة العادية .

الفرق بين تفاعل الكوثرة العادي والرقمي

الاختلاف الرئيس بينهما هو طريقة قياس كمية الحوامض النووية ، ويعتمد ذلك على عملية التخفيف . وتعد الطريقة الرقمية أكثر دقة من الطريقة التقليدية . وفي الطريقة العادية تتم التفاعلات في نموذج مفرد ، اما في الحالة الأخرى فان التفاعل يتم على نموذج مفرد بعد ان يقسم النموذج الأصلي الى أعداد كبيرة من النماذج قد يحوي الواحد منها على جزيئة واحدة او يكون خاليا ، وتتم عملية الكوثرة على كل نموذج مخفف بشكل منفصل ، وهذا التقسيم يكون أكثر حساسية لقياس كميات الحوامض النووية ، اذ تحلل النماذج بعد الانتهاء باستعمال الصبغات المتألقة للكشف عن وجود الاختلافات او الطفرات ، كما في تحديد الطفرات النادرة في جين ***ras*** في غائط المصابين بسرطان القولون Colorectal cancer .

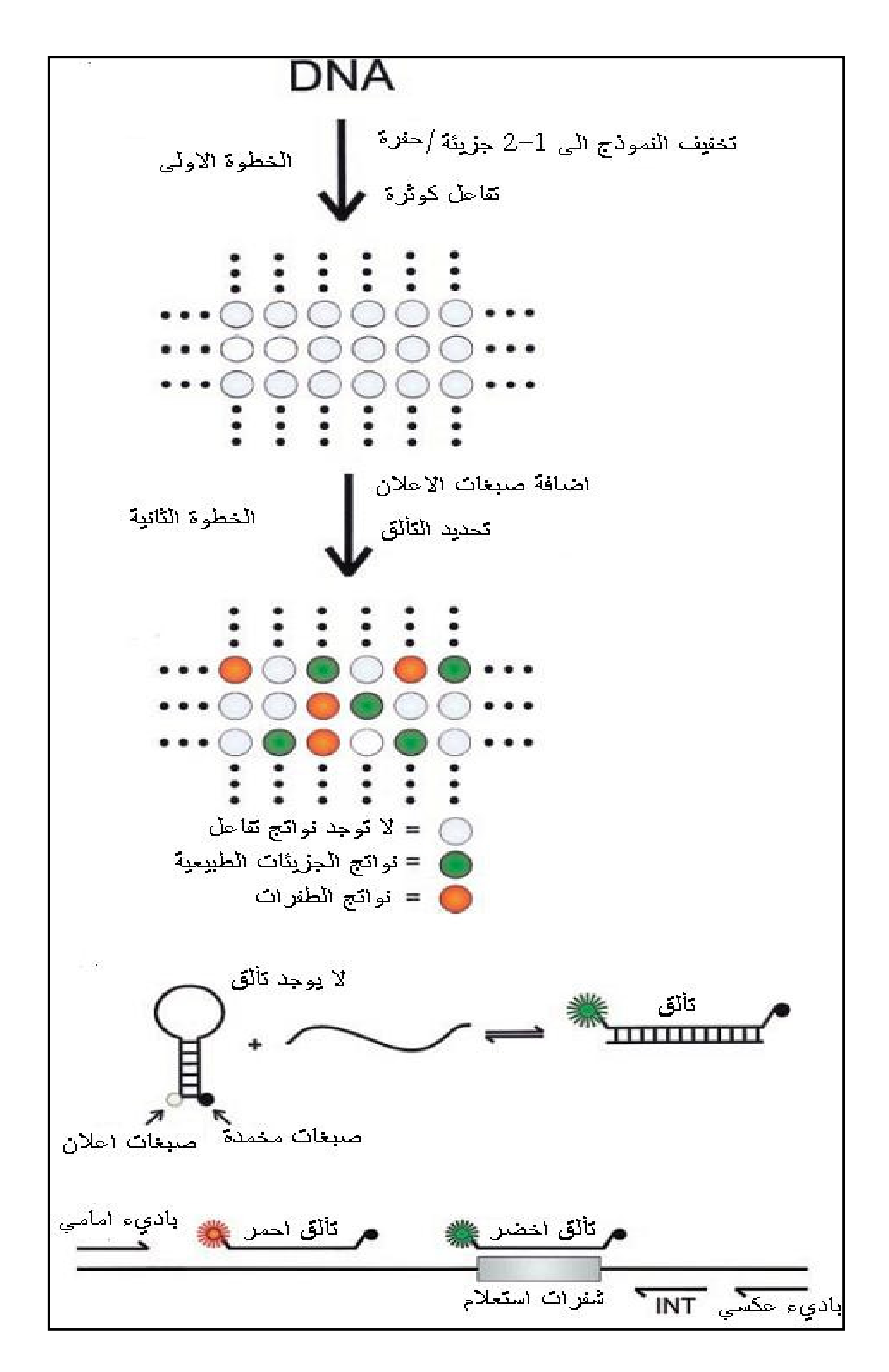
وبالإحساس العام فان الطفرات في الخلايا الجرثومية Germline تعد هي المهمة في فهم الأمراض التي تمتد على اكثر من جيل ، و لكن الطفرات الجسمية Somatic mutations تعد مهمة هي الأخرى ومن الأسباب الأولية في السرطان (وان كانت تقتصر على جيل واحد) ، وتلعب الطفرات الجسمية دورا مهما في الهرم وكذلك في الأمراض .

وتساعد طريقة الكوثرة الرقمية في الكشف عن Neoplastic cells في نماذج سهلة الحصول عليها مثل استعمال البول للكشف عن سرطان المثانة ، والغائط للكشف عن سرطان القولون ومقترباته والقشع في الكشف عن سرطان الرئة ، وهذه تكون مهمة جدا في المراحل الأولية حيث يكون المرض قابلا للشفاء ، وكل هذه لا يمكن الكشف عنها بالطرق العادية .

آليات تفاعل الكوثرة الرقمية

تتم عملية الكوثرة الرقمية باستعمال Well plates او الأنابيب الشعرية او وسائل ظهرت حديثا Microfluidic PCR devices وسوق منها أول جيل عام 2006 تحتوي على صمامات وغرف لتجزئة النماذج ، او استعمال وسائل أخرى مثل سطوح ترتبط اليها الحوامض النووية وهذا التخفيف او التشتيت يجعل النموذج اما حاويا على جزيئة واحدة يعطي التعريف (1 او +) او خالي من الحوامض النووية (0 او –) ، وبعد التضخيم يمكن تحديد الحفر او اي وسيلة أخرى الحاوية على نواتج PCR يعني التفاعل الموجب (+ve

reaction) . وفي الطرق العادية فان عدد نسخ الجزيئات يعتمد على العدد المبدوء به وكذلك عدد دورات التضخيم ، اما في الحالة الرقمية فانه لا يعتمد على الدورات كأساس لتحديد الكمية في النموذج وبذا يلغى الاعتماد على البيانات التزايدية غير الموثقة لتحديد كميات الحوامض النووية المستهدفة وبالتالي تكون المعلومات هي تحديد كمي فقط Absolute quantification وعليه فان التفاعل الرقمي يكون تفاعل عادي ولكن بعد التخفيف بحيث يكون كل وعاء تفاعل حاوي على جزيئة واحدة من DNA من الجزيئات التي كانت في النموذج الأصلي وبذلك يمكن الكشف عن جزيئات DNA التي توجد بمستويات واطئة جدا من النموذج الأصلي وتساعد في الكشف عن الجزيئات المطفرة مقارنة بالخلفية الحاوية على جزيئات DNA التي توجد بمستويات واطئة جدا من النموذج الأصلي وتساعد في الكشف عن الجزيئات المطفرة مقارنة بالخلفية الحاوية على جزيئات DNA طبيعية مثل تلك التي توجد في مراحل السرطان المبكرة ، وبذا تكون إشارات القراءة كمية اي رقمية بطبيعتها ، و يمكن إجمال التفاعل في الشكل الآتي (شكل 30) :



شكل 30 : خطوات تفاعل الكوثرة الرقمية

ففي الخطوة الأولى يتم تخفيف النموذج الى حد وجود 1–2 جزيئة في التخفيف ثم تجري عملية تفاعل كوثرة عادية . تليها الخطوة الثانية وفيها يتم تحليل نواتج التفاعل بالنسبة للحالة الاعتيادية (.W.T) والطفرات باستعمال صبغات خاصة ملائمة لكل حالة . و بما ان النواتج آتية من قالب واحد فهي تكون متجانسة التوالي . ثم تضاف

مجسات خاصة مثل MB (المرشدات الجزيئية Molecular beacon) وهي أول المجسات التي استعملت عام 1999 لهذه الطريقة وكما يلاحظ ان المجسات تحتوي على صبغة متألقة عند الطرف '5 وعامل مخمد عند الطرف '3 ، ودرجة إخماد التألق تتناسب عكسيا مع المسافة بين الصبغة المتألقة والمخمدة . فاذا كان توالي المجس مكملا لتوالي موجود في تواليات نواتج PCR فبعد عمليات التسخين والتبريد سيتهجن ويرتبط مع واحد من أشرطة نواتج التفاعل وهذا سيزيد المسافة بين الصبغة المتألقة وعامل الإخماد ويؤدي الى زيادة التألق ، ومن الشكل يكون اللون الأخضر مخصصا للأنواع الطبيعية والأحمر للطفرات . وبتحديد نوع التألق يمكن معرفة فيما اذا كان النموذج طبيعيا او حاويا على طفرة . وبما ان الخطوة الأولى من التفاعل هي تضخيم لأهداف دقيقة ومن كميات صغيرة جدا فيمكن استعمال طرق كوثرة أخرى مثل كوثرة العنقدة باستعمال بوادئ داخلية كما موضح أسفل الشكل ، كما يمكن زيادة وضوح النتائج بأمثلة الظروف وزيادة عدد الدورات للحصول على ناتج كبير ، وذلك لان الهدف في بعض الحفر لا ينتج حاصلا قابلا للكشف الا بعد حصول عدد كافي من الدورات وعليه كانت زيادة عدد الدورات ضرورية .

اما عملية الكشف وهي المتمثلة بالخطوة الثانية والتي تستعمل في الكشف عن نواتج الخطوة الأولى فيكون من الممكن استعمال مجس خاص بالطفرة فقط ولو انه من الأفضل استعمال مجس خاص بالطفرة وآخر خاص بالنوع الطبيعي ولكن الأمر قد يتعقد عند وجود أكثر من طفرة في التوالي تحت الفحص وعندها يكون الأفضل استعمال مجس واحد خاص بالنوع الطبيعي .

و للمجسات المستعملة مواصفات خاصة تقودها للارتباط بالنوع الطبيعي او الطفرة ، فمثلا للطفرات يكون طول العروة 14–26 قاعدة وبدرجة انصهار 54–56 °م والساق 4–6 قواعد كافيا . اما النوع الطبيعي فيمكن ان تكون العروة بطول 16 قاعدة وبدرجة انصهار 50–51 °م ، والساق 4 قواعد مثل '3-CACG -'5 وترتبط بصبغة تعطي لون اخضر (وهذه المواصفات خاصة بالدراسة التي على أساسها تم إيجاد dPCR) ، ويمكن ان تغير وفق الحاجة ويمكن للطريقة الكشف عن الطفرات حتى ولو كانت بمستوى 0.1٪ .

تجري مثل هذه التفاعلات في Well plate التي تحوي أكثر من 96 حفرة وهي الشائعة الاستعمال ، ويمكن استعمال صفائح تحوي على 384 حفرة او 1536 حفرة ، وبقياس التألق في هذه الحفر واستعمال التوزيع الإحصائي والطرق الإحصائية الأخرى يمكن تحديد مدى حدوث الطفرات .

و تتأثر الطريقة بعدة عوامل قد تعرقل استعمالها ومنها :

- ان خطوات التضخيم في المراحل المبكرة قد لا تكون تزايدية كما ذكر أعلاه .

• تفاعل الكوثرة يصل حد الركود بعد عدد من الدورات .
• التراكيز الأولية للحوامض النووية المستهدفة قد لا تضخم الى الحد الممكن الكشف عنه .
• اختلاف في كفاءة تفاعل PCR بين النماذج المختلفة وهذا يؤثر في صحة النتائج التي يتم الحصول عليها .

استعمالات الكوثرة الرقمية

الطريقة تجمع بين عمليات التضخيم وتحديد الكميات وبذلك تكون مهمة في العديد من الحالات خاصة وانها تضخم نسخة واحدة من DNA ومن الاستعمالات :

• تشخيص حالات السرطان المبكرة وكذلك لمراقبة تقدم وتراجع المرض .
• التعرف على التغايرات في تواليات الجين والطفرات النقطية Point mutations وكذلك الكشف عن Aneuploidy .
• تضخيم النسائل Clonal amplifications وتكون إحدى الوسائل للأجيال الجديدة من تحديد التواليات .
• ولأهمية الطريقة تم تطوير برامج حاسوب لتحليل نتائجها عام 2010 .
• تستعمل في تحديد الانتقال في الكروموسومات وغيرها من التغيرات كما في الفحص عن Leukemia cells حيث تستعمل مجسات للأليلات المنتقلة .
• تستعمل في دراسة تضخيم الجينات ودراسة نواتج الخياطة البديلة Alternative splicing وفيها تستعمل مجسات للاكسونات النادرة او الاكسونات الشائعة .
• تستعمل في تحديد التغير في التعبير الجيني لجينين حيث تستعمل مجسات للنسخة الأولى ونسخة للجين الثاني الذي يعد مرجعا . ويمكن تحديد التعبير الجيني حتى ولو في خلية واحدة .
• تستعمل للتميز بين الأليلات حيث تميز الطفرات في الأليلات سواء كانت واحدة او اثنين حيث تستعمل مجس للطفرة الأولى ومجس للطفرة الثانية .
• تستعمل في تحديد عدم توازن الأليلات اي للتحليل الكمي للواسمات غير المتغايرة Non-polymorphic markers وفيها تستعمل مجسات للواسمة من الكروموسوم تحت الدراسة مع واسمات من كروموسوم مرجعي .
• تستعمل في تحديد والكشف عن المستويات الواطئة من الممرضات .
• تستعمل في الكشف عن التواليات الغريبة .
• تستعمل في تحليل عمليات المثيلة المتباينة Heterogeneous methylation لجزيئات DNA .

كل هذه التطورات في الجوانب المختلفة يمكن ان تقود الى دراسة وتحديد الجينوم الشخصي Personal genomics .

<table>
<tr><th colspan="2">الفصل السادس</th></tr>
<tr><th colspan="2">المعلوماتية الحيوية و تفاعلات الكوثرة</th></tr>
<tr><td>تصميم البوادىء</td><td></td></tr>
<tr><td>الأسس المستعملة في تصميم البوادىء</td><td></td></tr>
<tr><td>أسس عمل البرامج</td><td></td></tr>
<tr><td>مواصفات البرامج والحاسبات</td><td></td></tr>
<tr><td>الحاسبات Calculators</td><td></td></tr>
<tr><td>برامج تصميم البوادىء والتعامل معها</td><td></td></tr>
<tr><td>جودة برامج تصميم البوادىء</td><td></td></tr>
<tr><td>الاختلاف بين البرامج في نتائج تصميم البوادىء</td><td></td></tr>
<tr><td>مؤشرات الجودة</td><td></td></tr>
<tr><td>مواقع بعض البرامج المتوفرة على شبكة الانترنيت</td><td></td></tr>
<tr><td>موسوعة تفاعلات الكوثرة PCR encyclopedia</td><td></td></tr>
<tr><td>بنك البوادىء PrimerBank</td><td></td></tr>
</table>

المعلوماتية الحيوية و تفاعلات الكوثرة
Bioinformatics and PCRing

دخلت المعلوماتية الحيوية مجالات علوم الحياة في معظم جوانبها بعد ان زادت البيانات في هذه الجوانب . والمعلوماتية الحيوية تقدم تحليل النواتج التي يتم الحصول عليها ، فضلا عن ان دراسات الحاسوب تعطي المقترحات المسبقة لغرض إجراء التجارب ، ثم المساعدة في تحليل النتائج وإيجاد العلاقات والاستنتاجات الممكنة ، وفي مجال تفاعلات الكوثرة كان للمعلوماتية الحيوية حضورا واضحاً في عمليات تصميم البوادىء التي تكون احد الأركان المهمة في عمليات الكوثرة ، ثم بعد ذلك وفرت الإمكانية لدراسة نواتج تفاعلات الكوثرة .

ويتناول هذا الجزء من الكتاب دور المعلوماتية الحيوية في تصميم البوادىء وتحليل نتائج الفصل على الهلام فضلا عن ذكر بعض الحاسبات المتوفرة على الانترنيت مباشرة Online او غير المباشرة Offline .

تصميم البوادىء

من المعروف ان اختيار البوادىء الملائمة يعد الأساس في تفاعلات الكوثرة ، خاصة عندما تتعقد هذه التفاعلات بوجود تفاعلات العنقدة Nested PCR والتفاعلات المتعددة Multiplex PCR . ومن جهة ثانية الزيادة الكبيرة في المعلومات الموجودة على الانترنيت وكثرة التواليات المودعة في قواعد البيانات ، لذلك ولجعل تفاعلات الكوثرة رخيصة وكفوءة فانها تحتاج الى بوادئ كفوءة . والمعلوماتية الحيوية مجال يمتد الى حقول متخصصة مثل البايولوجي الجزيئي الى الفيزياء الحيوية وعلوم الحاسوب والرياضيات والإحصاء . والتطورات التقنية في علوم الحاسوب وتقنيات المعلومات والاتصالات قدمت الإمكانيات والخوارزميات والبرامج لحل المشاكل في علوم الحياة وتحليل وتفسير البيانات لغرض تصميم وبناء قواعد البيانات الهامة والفاعلة لغرض تصميم التجارب ومن جوانبها المهمة التعامل مع تفاعلات الكوثرة في أكثر من خطوة مثل تصميم البوادىء وتحديد الظروف المثلى للتفاعل فضلا عن تحليل نواتج التفاعل ، اذ توجد لكل خطوة برامج وحاسبات Calculators للتعامل معها .

لذلك كان من الأفضل قبل الشروع بتفاعلات الكوثرة العملية البدء بالدراسات الحاسوبية *In Silico* studies . ومن الجدير بالذكر ان عملية تصميم البوادىء ليست من المهام السهلة . وباستخدام برامج معينة يتم الحصول على الآلاف من تشكيلات البوادىء ولكن البرامج تظهر أفضلها وأكثرها ملائمة لظروف التجارب التي تملى على البرامج المستخدمة مثل طول البادىء او العلاقة مع البوادىء الأخرى التي تلاؤم الظروف

التي يحددها المستخدم ، ولكن يجب تذكر ان المؤشرات المعطاة (القياسية) المستعملة في تصميم البرامج قد لا تعمل بشكل جيد مع العديد من التواليات لذلك تحتاج عملية التقاط البادىء ان تكون مقرونة بالواقع العملي ، وانتقاء الأجزاء الثابتة بين التواليات المختلفة قد تساعد في هذه العملية .

الأسس المستعملة في تصميم البواديء

منذ الأوقات المبكرة في هذا المجال اشتركت وتشترك برامج الحاسوب المستعملة في تصميم البواديء في الاعتماد على عدد من المؤشرات والحسابات لتصميم البواديء . وقد ذكرت بعض الجوانب والأسس ولكن لا بأس من التأكيد على بعض الجوانب والتي تحدد استنادا الى الهدف من التجربة (وبالمختصر هي ΔTm ، كماشة GC ، GC٪ ، تكامل البادىء مع القالب ومع البواديء الأخرى) ومنها الآتي :

طول البادىء

يتراوح العدد من 15-40 قاعدة نتروجينية ويكون الطول الأمثل 18-25 قاعدة ، ومن المعروف ان طول البادىء هو مجموع ما يحويه من القواعد النتروجينية الأربعة . ويعد طول البادىء دالة لتنافس المؤشرات الأخرى او لانفرادية البادىء Uniqueness وكذلك درجة ثبوت الهجين الناتج منه مع القالب فاستعمال البواديء القصيرة ذات طول 8-12 ينتهي بتكوين عدة نواتج في حين ان كل زيادة في طول البادىء ستؤدي الى زيادة خصوصيته في التهجين مع القالب ، و ان زيادة الطول تساعد في زيادة تحمل عدم التلاؤم Mismatch tolerance ، ولكن عملية الزيادة المستمرة في طول البادىء ستؤدي الى إحداث مشاكل أخرى مثل تكوين مزدوجات البواديء إضافة الى زيادة الكلفة ، لذا يجب الأخذ بنظر الاعتبار الموازنة بين هذه العوامل عند تصميم البواديء . وهذا ما تتعامل معه اغلب البرامج الموجودة .

ثبوت توالي أطراف البادىء

تختلف مواصفات طرفي البادىء ، فالطرف 3` يكون مسئولا عن عملية عدم الارتباط الصحيح Mispriming اذا لم يكن البادىء ملائما ولهذا السبب وضعت طرق لحساب ΔG للخمس قواعد الطرفية ، فالطرف الذي له قيمة قليلة (الأقل سالبية) يكون ذو ثبات قليل والذي يؤثر في عملية الارتباط لذلك يفضل ان يكون هناك على الأقل اثنين من النيوكليوتيدات (GC) عند الطرف 3 ` (GC clump) لتقلل من تنفس وتململ البادىء Primer breathing اي حركته ، وبذا ستزيد حاصل عملية الكوثرة المطلوب وتقلل من

الحزم الثانوية غير المتخصصة . ومثل هذه التواليات (GC) يفضل ان تكون عند الطرف 5' ايضا . اما حالة عدم التلاؤم فيمكن تحملها بمعدل 100/1 ، وهذا ما تظهره بعض البرامج .

وهنالك ايجابيات وسلبيات لحالة عدم التلاؤم في البواديء ، فعدم التلاؤم في موقع واحد عند النهاية 3' او قربها سيؤثر في ثبوت البواديء ويقلل من كفاءة تفاعل الكوثرة ويكون أكثر ضررا من عدم التلاؤم في المناطق الأخرى من البواديء . ويستفاد من عدم التلاؤم في 3-4 قواعد الى يسار الطرف 3' في حالة استعمال التطفير ARMS لذلك يتم إيجاد عدم التلاؤم عمدا عند تصميم البواديء المستعملة لهذا الغرض ، ويمكن لبعض البرامج إظهار حالة عدم التلاؤم ضمن مخرجاتها . وملخص الكلام ان الطرف 3' يستعمل في تحديد التخصص والطرف 5' يجب ان يكون ثابتا نسبيا .

محتوى البواديء وتوزيع القواعد النتروجينية

معظم البرامج تصمم البواديء بمحتوى GC بحدود 40-60 ٪ ، وتختلف البرامج في هذه الخاصية فالبعض يصمم بواديء بمحتوى اقل وأخرى بمحتوى اكبر ، وتشمل هذه كماشة GC التي تمثل زوج من القواعد هي CC، GC، CG ، GG عند الطرف 3' وهي التي يعتقد انها تساعد في خلق هجين ثابت او ما يشبه الكماشة عند الكوثرة بإنزيم Taq . وعلى العموم فان نسبة محتوى الباديء من الكوانين والسايتوسين GC% تكون صفة مميزة للبوادئ وتعطي معلومات عن قوة الالتحام والتأثير في درجات الانصهار والالتحام ، ومنها تقوم البرامج بحساب بعض المؤشرات التي تظهر كصفات للبواديء المقترحة . وعند احتواء الباديء على نسبة GC اقل من 50٪ فيجب إطالة الباديء أكثر من 18 قاعدة نتروجينية كحد أدنى للحفاظ على درجة الانصهار لتكون أعلى من الدرجة الحرارية الموصى بها والحد الأدنى لها هو 50°م .

وتأخذ البرامج بنظر الاعتبار عدم وجود التعاقبات او قطيفات لمكررات القواعد مثل Poly A او Poly T او Poly C او Poly G (لان هذه تؤدي الى تنفس وتململ وفتح معقدات الباديء مع القالب) ، كما انها تشجع الالتحام غير المتخصص ، كما تتجنب Poly (C،T)pyrimidines او Poly purines (G،A) التي تكون شاذة في المزدوجات التي تكونها ، كما انها يجب ان تكون خالية من التكاملات الطرفية Palindromes .

وفي الحالات المثالية فان البواديء يجب ان تحتوي على خليط عشوائي من القواعد وبنسب ملائمة . ولكن بعض الأحيان يتم الحصول على باديء يحوي على منطقة غنية بقواعد T،A تحيط او تجنح منطقة غنية بقواعد C،G وهذه حالة غير مرغوبة فيها ويحذر البرنامج

منها بإظهار رسالة خاصة بها ولكن يعطي مؤشرات لها مثل حرارة الالتحام و فق الحسابات التي يتضمنها .
وفي حالات خاصة مثلا عندما يراد استعمال نواتج الكوثرة في الكلونة فعندها تضاف قواعد إضافية لتكون موقع فلق الإنزيمات القاطعة ، لذلك يصمم بادىء بطول 18 نيوكليوتيد تطابق القالب تماما ثم تضاف ست قواعد تمثل موقع القطع او الفلق إضافة الى قاعدتين للمساعدة في عملية القطع وذلك لان بعض إنزيمات القطع تحتاج ان ترتبط على موقع أوسع من موقع الفلق نفسه ، والبرامج الخاصة في هذا المجال تقترح نوع الإنزيمات التي يرغب المستخدم في استعمالها وعلى ضوء ذلك تضاف القواعد الإضافية .

التكامل والتكامل الذاتي

من المعروف ان الأشرطة المفردة لجزيئات DNA تكون عادة غير ثابتة بشكل كبير جدا ، وتنطوي على نفسها او ترتبط بأشرطة أخرى مكونة تراكيب ثانوية . وثبوت هذه التراكيب يعتمد بشكل كبير جدا على الطاقة الحرة وحرارة الانصهار . وتكامل الأشرطة يعد من المشاكل المهمة جدا ، اذ ان وجودها يمكن ان يؤدي الى ظهور مزدوجات البوادىء وكذلك ماشات الشعر والتراكيب الثانوية في البادىء نفسه والتي يعتمد ثبوتها على التواليات المتكاملة ، ووجودها يؤدي الى تقليل جزيئات البادىء الجاهزة للتفاعل . وماشات الشعر تنتج في البادىء نفسه عند وجود تكامل بين أكثر من 3 قواعد ويمكن ان تنتج تراكيب معقدة منها مثل التراكيب الصليبية الشكل او الانتفاخات Bulges او العروات الداخلية .
والتراكيب الثانوية يمكن ان تحدث في القالب او البوادىء وفي الحالتين تكون غير مرغوبة فيها ، فعند تصميم بوادئ لقوالب معروفة انها تكون تراكيب ثانوية ثابتة حتى بدرجات حرارة أعلى من حرارة الالتحام فتكون البوادىء غير قابلة للارتباط عمليا وهذا يؤثر في حاصل التفاعل ، لذلك يكون من الضروري تصميم بوادئ للمناطق من القالب التي لا تكون تراكيب ثانوية ثابتة أثناء التفاعل .
ويمكن ان يكون البادىء المصمم معرض لتكوين المزدوجات سواء الذاتية اي بين جزيئات البادىء نفسه او مع جزيئات أخرى اي يجب تجنب Intraprimer homology و Interprimer homology ، وبعض البرامج تحسب حرارة الانصهار لهذه الجزيئات المتكونة ، وقد تعالج هذه عمليا بتقليل كميات البوادىء في التفاعل كما مر ذكره .
و من النقاط الأخرى تجنب Cross homology لتحسين تخصص البوادىء الذي يجب ان لا يضخم جينات او تواليات غير مقصودة قد توجد في خليط النماذج . لذلك وبعد

تصميم البوادىء تجري لها عمليات اصطفاف باستعمال برنامج BLAST(**B**asic **l**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) لاختبار تخصصه مقابل قاعدة البيانات nr (non-redundant (كما سيأتي ذكره لاحقا .

درجات حرارة الانصهار والالتحام

من النقاط والأساسيات المهمة التي تعنى بها برامج تصميم البوادىء درجات حرارة الانصهار والالتحام والنسبة المئوية لمحتوى البادىء من GC التي تكون ذات علاقات متداخلة . فالمواصفات العامة التي تستخدمها البرامج تكون حرارة الانصهار بين 55-65 °م التي تقابل الى حدٍ ما 45-55 ٪ من GC لبادىء مكون من 20 قاعدة . وكل برنامج يستعمل طريقة معينة لحساب Tm ، لتكون أعلى بخمس درجات من حرارة الالتحام . وتمثل حرارة الالتحام إشارة ثبوت هجين DNA/DNA وتتخذ قاعدة لتحديد Ta التي عندما تكون عالية فانها لا تؤدي الى جعل عملية تهجين البادىء مع القالب كفوءة وتنتج عنها قلة في نواتج تفاعل الكوثرة او نواتج غير المتخصصة .

مؤشرات أخرى مهمة في تصميم البوادىء

من المؤشرات الأخرى التي تؤخذ بنظر الاعتبار عند وضع البرامج هو طول الناتج من التفاعل والذي يحدد بالهدف من التجربة فبالنسبة لطريقة qPCR مثلاً يكون طول الهدف بحدود 100 قاعدة ولكن في حالة تفاعلات الكوثرة العادية يصل الى حوالي 500 قاعدة وهذه الحدود لا تلغي الأطوال الأخرى ، وتظهر بعض البرامج مثل Primer3 المرتبط مع BLAST مواقع ارتباط البادىء الأمامي والبادىء الخلفي وعندها يمكن حساب طول الهدف الذي يضمه زوج البوادىء وفق المعادلة الآتية :

طول الناتج = موقع البادىء الأول – موقع البادىء الثاني + 1

والمعروف ان البوادىء ترتبط الى النهاية '3 او '5 لأي هدف ذو طول محدد، وتفضل البوادىء التي ترتبط الى النهاية '3 من الهدف لانها أكثر موثوقية .

ومن المؤشرات الأخرى التي تأخذها بعض البرامج بنظر الاعتبار :

- تركيز الأملاح .
- تركيز DNA القالب .
- عدد القواعد التي تهمل Skip بعد قبول البادىء .
- إبعاد المناطق التي تكون ذات نوعية غير جيدة وعدم إدخالها في الحسبان عند تصميم نموذج DNA معين ، وفي هذه الحالة يمكن للمستخدم تحديد مؤشرات أخرى اعتمادا على المنطقة المراد تضخيمها.

• الفرق في درجات حرارة الالتحام لزوج البادىء التي يجب ان لا تكون كبيرة ويمكن ان تحدد من قبل المستخدم .
• ان تكون النهاية '3 للبادىء الأول لا ترتبط الى اي موقع من البادىء الآخر .
• كل نواتج تفاعل الكوثرة يجب ان تكون متساوية .

وبذا يلاحظ ان البرامج تعتمد على حركيات الارتباط وفك الارتباط لمزدوجات البادىء مع القالب عند درجات الالتحام والانصهار وثبوت المزدوجات غير المتوائمة Mismatched nucleotides ومواقعها و كفاءة إنزيمات الكوثرة للتعرف على Mismatched duplexes وكل هذا يؤخذ بنظر الاعتبار وكل ما ورد أعلاه من الجوانب .

أسس عمل البرامج

عند وضع وكتابة شفرات البرامج يؤخذ بنظر الاعتبار المؤشرات المذكورة في مستهل مقومات تصميم البوادىء . وهذه المؤشرات يمكن ان تثبت كقيم أساسية Default في البرنامج او تكون قابلة للتغيير وفق احتياجات المستخدم . والحالة الأخيرة توجد في معظم البرامج الموجودة على شبكة الانترنيت . وبعد إجراء عمليات الاصطفاف مع قواعد البيانات الخاصة بالبرنامج او مع قواعد البيانات العامة كما في البرنامج الموجود على موقع NCBI يقوم البرنامج بتكرار الشروط العامة او التي يمليها المستخدم بواسطة الخوارزمية Algorithm التي كتبت بها شفرة البرنامج لإيجاد البوادىء المرشحة والتي تكون ضمن المواصفات العامة مثل :

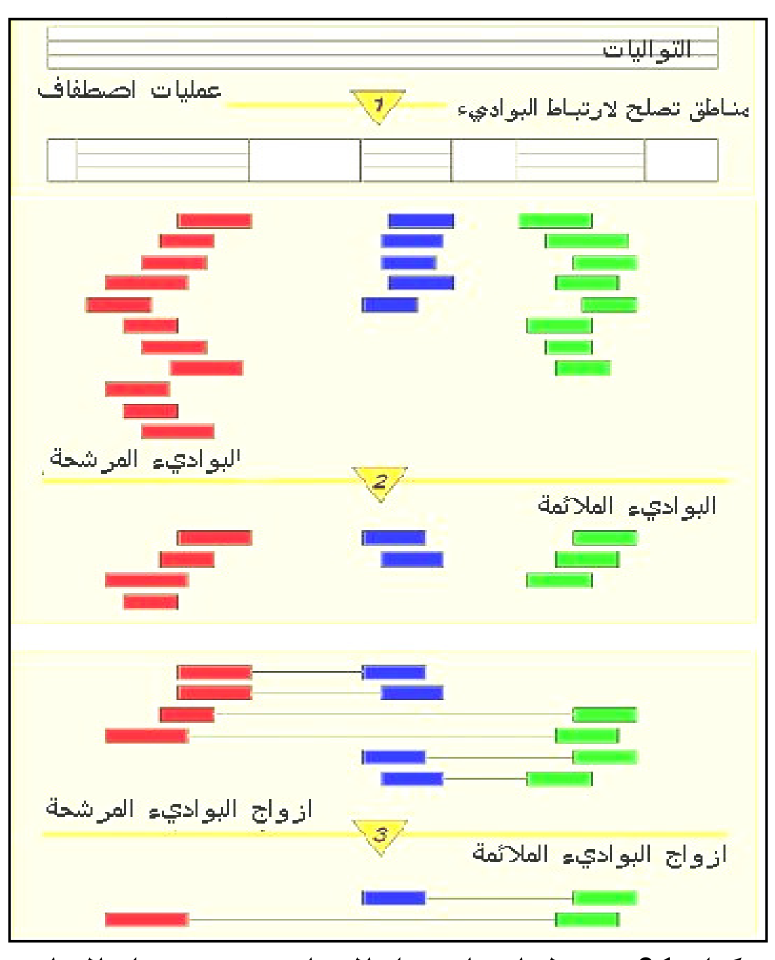
- عدم التكرار مثل acgtacgtacgtacgt
- عدم وجود مناطق غنية بـــ GC او خالية منها .
- عدم وجود امتدادات طويلة من قاعدة واحدة مثل AAAAAAAAAA .
- عدم إمكانية تكوين ماشات الشعر .
- عدم وجود إمكانية تكوين مزدوجات البوادىء باختلاف أنواعها .
- درجة حرارة الالتحام ضمن المدى الذي يحدده المستخدم .

بعد ذلك يبدأ البرنامج باستعمال البوادىء المرشحة للبحث عما يقابلها او يكملها من DNA الهدف في قواعد البيانات العامة او الخاصة به وانتخاب البوادىء المقبولة من ناحية حسابات الطاقة ومواصفات الالتحام ، ثم البدء بعمليات الانتخاب الأخرى التي تلاؤم الشروط ومنها :

- الفرق بدرجات الحرارة لا يزيد عما حدده المستخدم .

- ان تكـون المنطـقـة التـي يرتبط إليـها البـواديء ضـمـن او تجـنح المنطـقـة التـي (قـد يحـددها المسـتخـدم
- البـواديء النـاتجـة لا تكـون مـزدوجـات .
- النـهـايـة '3 للبـاديء لا تـرتبـط الى أي مـنـطـقـة مـن البـواديء الأخـرى .
- البـواديء النـاتجـة لا تكـون مـاشـات الشـعـر خـاصـة عـنـد درجـات الالتحـام .
- ان تكـون النـواتج بالحـجـم الـذي حـدده المسـتخـدم .

أي يكـون هنـاك تكـرار والتـزام بالشـروط الموضـوعـة ضـمـن شـفـرة البـرنـامـج .
ويمكـن تلخـيص ذلـك بالمخـطط الآتي (شـكـل 31) :



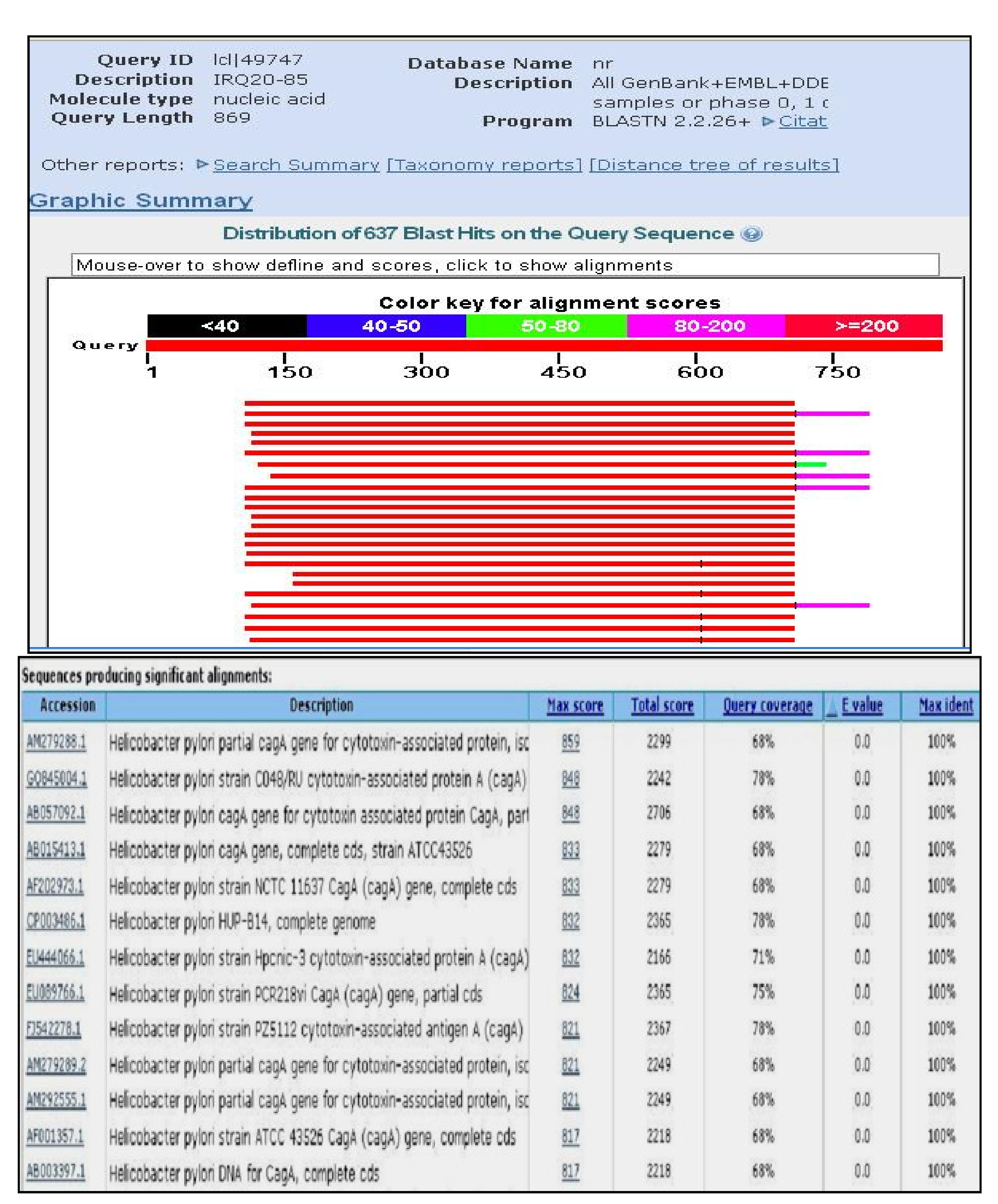
شـكـل 31 : خـطـوات اختـيـار البـواديء مـن قـبـل البـرامـج

وفي جـمـيـع الأحـوال يجـب ان يـكـون هـنـاك تحـمـل لحـد مـا لحـالات عـدم الـتـلاؤم Mismatch tolerance لان لـهـا الـتأثـيـر الأكـبـر في تخـصـص تـفـاعـل الكـوثـرة . ولـذلك فـان مـعـظـم الـبـرامـج تحـدد عـدم التـلاؤم بمعـدل 1\100 في الـتـفـاعـلات الـعـامـة . ونـظـرا لـكـثـرة واخـتـلاف الـنـقـاط

الأساسية او الفرعية المعتمدة في تصميم البواديء لذلك يفضل ان تذكر على انفراد ومنها :

- بعض البرامج تجري مسح على التواليات المقدمة للحصول على بواديء لها وفيها يتم إهمال المناطق او التواليات التي تكون محتوياتها من GC اقل من 20٪ والأخرى الأكثر من 80٪ (<20%-80%>) . ولكن بعض البرامج تسمح بمحتو من GC أعلى من الحدود المذكورة في حالات خاصة من التطبيق كما في عمليات الكوثرة التفاضلية Differential display PCR (DD PCR) . وكذلك عند استعمال برنامج لتصميم باديء يرتبط بالمناطق غير القابلة للترجمة (3'–untranslated regions) اذ تكون هذه المناطق عالية المحتوى من AT ويصل الى 60–80٪ .
- تعتمد بعض البرامج على استعمال معادلات وطرق خاصة في حسابات درجات الحرارة وتذكر هذه عادة في ملحقات البرنامج او في البحث الأصلي الذي قدم للبرنامج ، كما ان بعض البرامج تستعمل طرق مدمجة لحساب درجات الحرارة واستعمال أكثر من جدول للـ Thermodynamics كما في برنامج dnaMATE لذلك تكون Tm المحسوبة أكثر دقة وملائمة للتطبيقات العملية .
- اغلب المشاكل عند تصميم البواديء تحدث عندما تكون هناك مناطق غنية بـ AT تحيط مناطق غنية بـ GC لذلك يحذر البرنامج من هذه الحالة عند تصميم مثل هذه البواديء .
- عند استعمال البرامج لتصميم بواديء الكلونة يقوم البرنامج تلقائيا بترشيح باديء مكون من 18 قاعدة ويضيف لها 6 قواعد لموقع الانفلاق فضلا عن وزيادة 2 قاعدة لزيادة كفاءة أداء الإنزيمات .
- بعض البرامج تتيح إمكانية اختيار كماشة GC مثل CC,GG,GC,CG كما في البرنامج PRIME+ .
- قد يكون البرنامج ضمن حزمة من البرامج Package كما في حزمة The PCR suite الحاوية على عدة برامج تعتمد أساسا على البرنامج Primer3 الأكثر استعمالا لتصميم البواديء .
- بعض البرامج تكون مرتبطة بقواعد بيانات عامة مثل GenBank . ومن هذه البرامج ما يختص بتصميم بواديء للاكسونات ، وفي هذه الحالة يحتاج البرنامج الى تعريف جيد بالجين لذا يربط الى قاعدة البيانات هذه . وكذلك الحال مع البرامج الخاصة بتصميم البواديء للـ SNPs لذلك تربط الى قاعدة البيانات GenBank (dbSNP) للحصول على GenBank file ذات المعلومات الوفيرة لتصميم البواديء ، وكذلك الحال مع تصميم

البوادىء للـــ cDNA الذي يعطي او يصمم بوادىء حــول اطــر القــراءة المفتوحــة ORFs ويحتاج الى تحميل الملف الخاص الحاوي على الجين .
تختلف البرامج في الصيغ التي تتقبلها ، فمثلا اغلب البرامج تستعمل صيغة FASTA ، والبعض الآخر يعتمد نتائج الاصطفاف لعدة تواليات ولكن يجب ان تكون بصيغ خاصة فمثلا البرنامج PriFi يتقبل فقط aln file المتخصص بإيجاد البــوادىء للتواليــات مــن أنواع متقاربة وليست متماثلة تماما .
والنقاط المذكورة أعلاه قد لا تكون هي التوجهات العامة ، فهناك بعض الـبرامج تمتلـك مواصفات أخرى تؤهلها ان تقدم خدمات أكثر ، فالعديد من البرامج توفر إمكانية إجــراء فحوص على البوادىء باستعمال صفات مدمجة في شفرة البرنــامج Built in لتعطــي نتائج حول حالات الطوي Folding وكــذلك إعطــاء مكونــات البــادىء ، وتــوفر حاســبات لحساب التخافيف وقيــاس OD و Extension coefficient و محتــوى GC والــوزن الجزيئــي وتحديد التراكيب الثانوية مثل رباعيات الكوانين (G_4) ، وإظهار فيما اذ كان هناك إمكانية تكوين ماشات الشعر وقيم الطاقة الحرة ΔGs لهــا . وفضــلا عــن ذلــك تحــدد التواليــات القصيرة SSR في القالب ، وإظهــار التحــويرات مثــل عنــد وجــود Inosine او Uridine او LNA ، واظهار المواقع الملائمة للقطع بإنزيمات القطع بأنواعهــا (III,II,I) . وتقــوم بعــض البرامج بترجمة التواليات سواء كانت DNA او RNA الى الببتدات او البروتينات المقابلة وبستة الأطر (Six frames) لجزيئــات DNA القياســية ، والــبعض الآخــر يمكــن ان يجــري عمليات الترجمة العكسية أي إيجاد DNA من تواليات الحوامض الامينية .
وعلى العموم وبعد الحصول على البوادىء المرشحة من أي من البرامج والتي تكون بحــدود 5 أزواج ويمكن زيادتها ، لابد من إجراء بعض العمليات للتأكــد منــها قبــل اســتعمالــها ، ويكون ذلك بإجراء عمليات اصطفاف لها BLASTing . إذ أن هذه العملية ستشــير الى مدى صــلاحية البــوادىء للاســتعمال بعــد عرضــها علــى آلاف التواليــات واســتخلاص المناسب منها والإشارة إليها كما موضح في الشكل الآتي (شكل 32)



Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AM279288.1	Helicobacter pylori partial cagA gene for cytotoxin-associated protein, isc	859	2299	68%	0.0	100%
GQ845004.1	Helicobacter pylori strain C048/RU cytotoxin-associated protein A (cagA)	848	2242	78%	0.0	100%
AB057092.1	Helicobacter pylori cagA gene for cytotoxin associated protein CagA, part	848	2706	68%	0.0	100%
AB015413.1	Helicobacter pylori cagA gene, complete cds, strain ATCC43526	833	2279	68%	0.0	100%
AF202973.1	Helicobacter pylori strain NCTC 11637 CagA (cagA) gene, complete cds	833	2279	68%	0.0	100%
CP003486.1	Helicobacter pylori HUP-B14, complete genome	832	2365	78%	0.0	100%
EU444066.1	Helicobacter pylori strain Hpcnic-3 cytotoxin-associated protein A (cagA)	832	2166	71%	0.0	100%
EU089766.1	Helicobacter pylori strain PCR218vi CagA (cagA) gene, partial cds	824	2365	75%	0.0	100%
FJ542278.1	Helicobacter pylori strain PZ5112 cytotoxin-associated antigen A (cagA)	821	2367	78%	0.0	100%
AM279289.2	Helicobacter pylori partial cagA gene for cytotoxin-associated protein, isc	821	2249	68%	0.0	100%
AM292555.1	Helicobacter pylori partial cagA gene for cytotoxin-associated protein, isc	821	2249	68%	0.0	100%
AF001357.1	Helicobacter pylori strain ATCC 43526 CagA (cagA) gene, complete cds	817	2218	68%	0.0	100%
AB003397.1	Helicobacter pylori DNA for CagA, complete cds	817	2218	68%	0.0	100%

شكل 32 : نتائج الاصطفاف الصورة والنصية

وعندما تكون نتائج الاصطفاف رديئة وغير ملائمة يمكن تغيير مؤشرات برنامج BLAST الأصلية مثل تغيير قيم الفجوات Gaps او قيم E values وكذلك التحكم بمؤشر Word size ونسبة تطابق السماح Facilitate permissive لزيادة نسبة التشابه للتواليات وبالتالي قبول الباديء وهذه تكون مبنية على المعلومات النصية لعملية

التأكد . وفي حالة الفشل يصار الى تصميم بوادىء جديدة باستعمال برامج أخرى وإعادة الكرة من عمليات التأكد . **وفي النهاية يمكن القول ان البوادىء الجيدة هي التي تحوي على خليط عشوائي من القواعد للحالات العامة .**

مواصفات البرامج والحاسبات

استعمال برامج الحاسوب في التطبيقات البايولوجية وخاصة في تصميم البوادىء وتحليل نتائج تفاعلات الكوثرة أعطى بعدا جديدا لحقل المعلوماتية الحيوية ، لذلك فان العديد من الجامعات أنشأت مزودات خدمة (Servers) تسمح لأي مستخدم الدخول اليها وإجراء التحليلات والدراسة للجزيئات الحيوية الخاصة به .

و لذلك كانت البرامج اما مستقلة الاستعمال Stand-alone (Offline) اي يعمل البرنامج دون الحاجة للاتصال بالانترنيت بعد تحميله مع ملفاته التشغيلية ، او تكون Integrated network version (Online) اي تكون مندمجة في مواقع خاصة على الانترنيت ، والأخيرة أكثرها للبرامج التجارية .

وتستعمل البرامج المؤشرات الفيزياوية المذكورة سلفا والمواصفات الأخرى ، وتتفق معظم البرامج على ان يكون البادىء المصمم فريدا من نوعه للتكامل مع الهدف وبمواصفات خاصة ، وخاصة القواعد عند الطرف '3 .

ومن الجدير بالذكر ان البرامج لا تستعمل فقط للتصميم وانما تستعمل للتأكد من صلاحية البوادىء المصممة واحتمالية تكوين ماشات الشعر او التراكيب الثانوية الأخرى او المزدوجات الناتجة من التحام البوادىء مع نفسها او مع جزيئات البوادىء الأخرى .

الحاسبات Calculators

بعض البرامج تتضمن حاسبة في تصميمها Built in هذه تقوم بعمل الحسابات المطلوبة بعد استعمال البرنامج لتصميم البادىء ، او تكون بمثابة نوافذ تملى عليها المواصفات المطلوبة قبل تصميم البادىء .

و فضلا عن ذلك توجد حاسبات ممكن ان تعطي النتيجة لواحد او زوج من البوادىء و منها :

Tm calculator الموضح في الشكل 33 :

Tm Calculator

Directions:

To calculate the optimal melting temperatures of your primers, enter each primer's concentration, its 5'-3' sequence, and the salt concentration (K+ and Na+) of your PCR or Real-Time PCR reaction.
Note: If entering info only for Primer #1, ignore result values given for Primer #2.

Primer #1

Salt Concentration (mM) 50 Primer Concentration (µM) .2

5' 3'

Primer #2

Salt Concentration (mM) 50 Primer Concentration (µM) .2

5' 3'

Submit Clear

Tm Calculator

Directions:

To calculate the optimal melting temperatures of your primers, enter each primer's concentration, its 5'-3' sequence, and the salt concentration (K+ and Na+) of your PCR or Real-Time PCR reaction.
Note: If entering info only for Primer #1, ignore result values given for Primer #2.

Primer #1

Salt Concentration (mM) 50 Primer Concentration (µM) .2

5' GCCAATTCAATGGCAATTCT 3'

Primer #2

Salt Concentration (mM) 50 Primer Concentration (µM) .2

5' GCCAATTCAATGGCAATTCT 3'

Submit Clear

Tm Calculator Results

Results for these primers are as follows:

Primer	Tm (DegC)	Salt (mM)	Primer (µM)	%GC	Length
Primer #1: GCCAATTCAATGGCAATTCT	58.43	50	.2	40	20
Primer #2: GCCAATTCAATGGCAATTCT	58.43	50	.2	40	20

Tm Delta = 0.00

ReSubmit

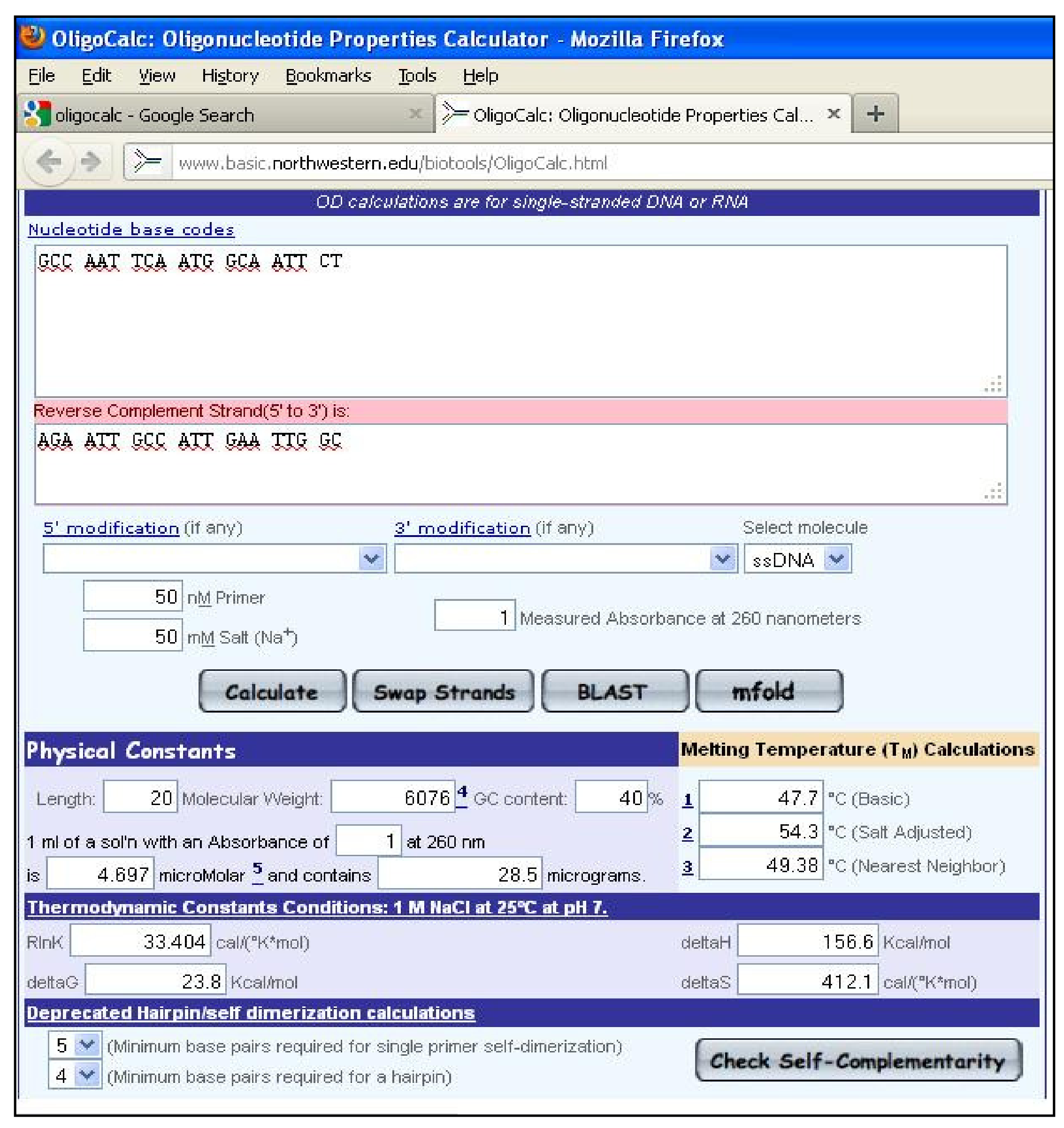
Do another Tm Calculation

شكل 33 : حاسبة درجة الانصهار

وتحتاج الحاسبة الى إدخال توالي كل من البادىء الأمامي Forward وكذلك توالي البادىء العكسي Reverse . لتعطي النتائج الموضحة في الشكل أعلاه .

وتظهر النتائج حرارة الانصهار لكل من البواديء وكذلك التركيز الملائم استعماله و تركيز الأملاح الملائمة فضلا عن طول البواديء المدخلة . ومن المهم ملاحظة ان الحاسبة تعطي الفرق في درجات التحام البواديء وفي المثال أعلاه تكون صفر °م . والفرق بينهما في الحرارة يجب ان لا يتجاوز 5 °م .

و من الحاسبات المهمة الأخرى للتعامل مع البواديء هي Oligocalc (Oligonucleotide properties calculator) . وهذه تمتلك إمكانات أوسع من الحاسبة Tm calculator . تفرد الحاسبة حسابات كل باديء كما هو موضح في واجهة الحاسبة (شكل 34)



شكل 34 : حاسبة OligoCalc

ونواتج حسابات هذه الحاسبة تحسب عند تركيز 50 ملي مول من الأملاح الذي يكون قياسي بالنسبة لتفاعلات الكوثرة . والحاسبة يمكن ان تحسب درجات الانصهار Tms او تعدلها وفق جدول من التراكيز المختلفة من الأملاح و Formamide والتي تتم وفقا لرغبة المستخدم .

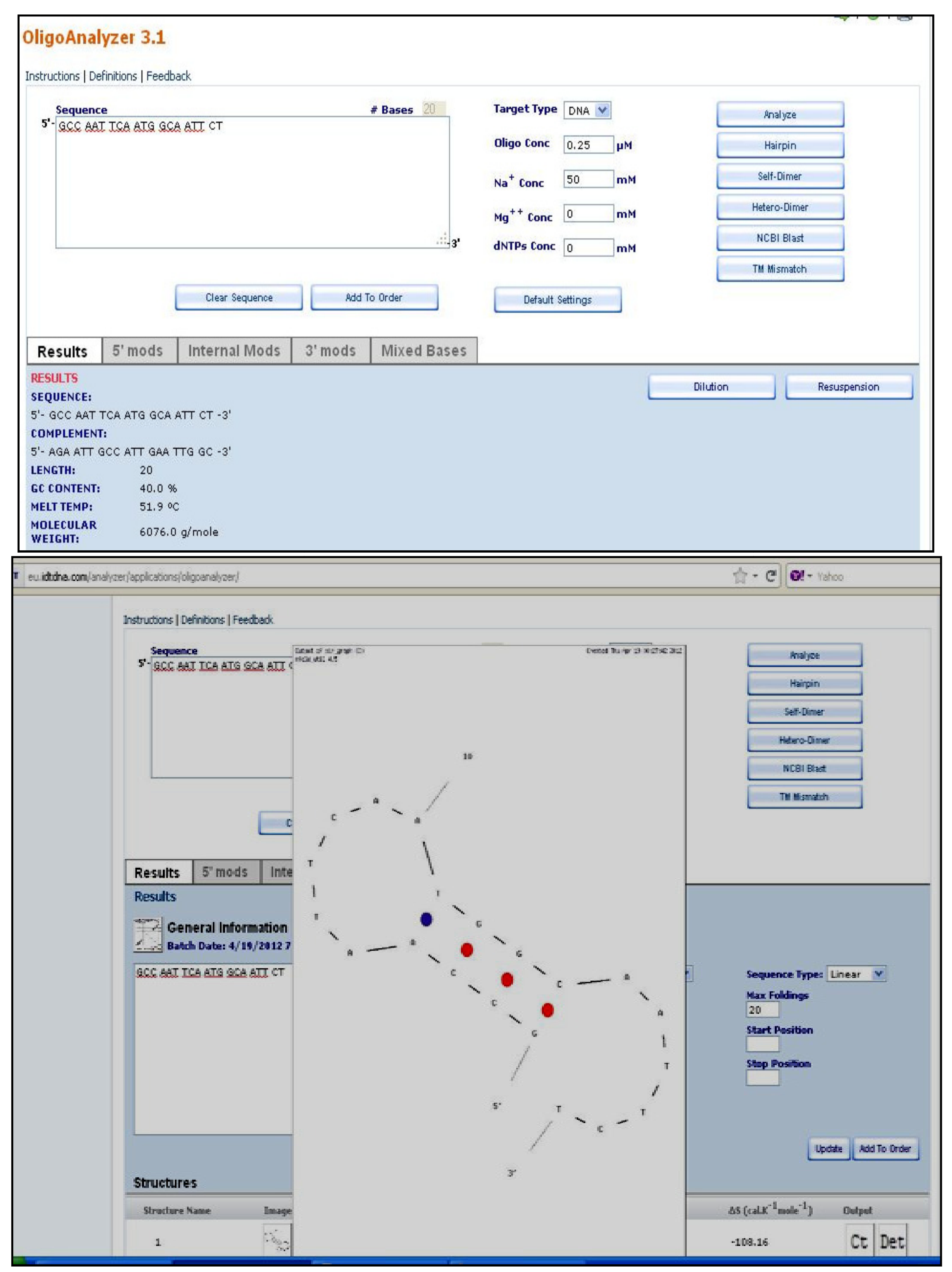
و تظهر الحاسبة مدى إمكانية تكون مزدوجات البواديء Primers dimers . وتظهر في حالة وجودها قيم GΔ عندما يكون المؤشر الأخير صغيراً يكون هو الأفضل ولكن مع ذلك يجب تجنب البواديء التي تلتحم عند قيم GΔ تساوي 7- كيلوسعرة /مول او أكثر .

وتختلف الحاسبات في الطرق التي تحسب درجات الانصهار فمثلا بالنسبة للحاسبة المعنية (OligoCal) تكون درجة الانصهار لباديء محدد هي 62.6 °م عند استعمال واعتماد GC ٪ ولكن عند استعمال معادلة Wallace تكون 52° م . لذلك وجب الانتباه الى الطرق المعتمدة في مثل هذه الحاسبات وأفضلها طريقة الجوار الأقرب .

و تكامل التواليات عند تكوين المزدوجات او التراكيب الثانوية يكون اقل أهمية عند وجود TA عند النهاية '3 وهذه لا تشكل مشكلة لانها ليست ثابتة جدا ولكن التكامل من النوع GC يمكن ان يسبب مشاكل عندما تكون درجة الانصهار Tm اقل من 65°م .

حاسبات Integrated DNA technology (IDT)

حاسبات تتوفر على الانترنيت ومنها حاسبة تساعد في إجراء التحويلات بين وحدات القياس المختلفة . فضلا عن إمكانية إيجاد التراكيب الثانوية وماشات الشعر كما موضح في الشكلين الآتيين :



شكل 35 : حاسبات (IDT) Integrated DNA technology

فضلا عن إمكانيات أخرى ظاهرة في الجهة اليمنى من الشكل . وهي إحدى الحاسبات المهمة في مجال تفاعلات الكوثرة ، فهي بالإضافة الى حساب درجات الحرارة للانصهار والالتحام ، وإظهار ماشات الشعر والمزدوجات للبواديء المدخلة للحاسبة ، فانها تساعد في إجراء عمليات الاصطفاف مقابل قواعد الموقع NCBI ، وتساعد في حساب تأثير التحويرات التي تجري على توالي البادىء ، وبالتالي يكون البادىء الموافق للمؤشرات المستعملة قابل للاستعمال مباشرة .

وتوجد حاسبات تهتم بمسائل الطاقة وعلاقتها بحرارة الانصهار كما في الحاسبة التابعة الى لمؤسسة باستور الموضح واجهتها في الشكل 36 :

mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::melting

Mobyle @Pasteur

Welcome | Forms | Data Bookmarks | Jobs | Tutorials

melting ×

MELTING 4.1f

enthalpy, entropy and melting temperature

Run | Reset

* Hybridisation type (-H) Choose an hybidation type
* Nearest Neighbor parameters set (-A) Default
* Sequence string (-S)
Complementary sequence (-C)
* Salt concentration (-N) ?
* Nucleic acid concentration in excess (-P) ?
Nucleic acid correction factor (-F)
Salt correction (-K)
Force approximative temperature computation (-x) No
Use parameters for dangling ends (dnadnade.nn) (-D)? No
Use parameters for mismatches (dnadnamm.nn) (-M)? No

شكل 36 : حاسبة مؤسسة باستور

وتوجد حاسبات أخرى تتفاوت في جودتها والأغراض التي تستعمل من اجلها .

وهناك حاسبات أخرى تهتم أيضا بتفاعلات الكوثرة وحساب التراكيز بشكل خاص الموضحة واجهاتها في الشكل الآتي (شكل 37)

Nucleic Acids Calculator [HELP]

Enter Parameters	
OD260	
OD280	
Dilution factor	
DNA/RNA Stock Volume (ul)	
type of nucleic acid	select

Calculate | next sample | All Clear

Results	
measured DNA/RNA conc (ug/ ul)	
OD260/OD280 ratio	
stock DNA/RNA conc (ug/ ul)	
Total Amount of DNA/RNA (ug)	

1 OD260 Unit = 50ug/ml for double-stranded DNA
1 OD260 Unit = 40ug/ml for single-stranded RNA
1 OD260 Unit = 40ug/ml for single-stranded DNA
1 OD260 Unit = 20ug/ml for single-stranded oligonucleotides

BioMath Calculators

OD_{260} Units of Nucleic Acid to Concentration

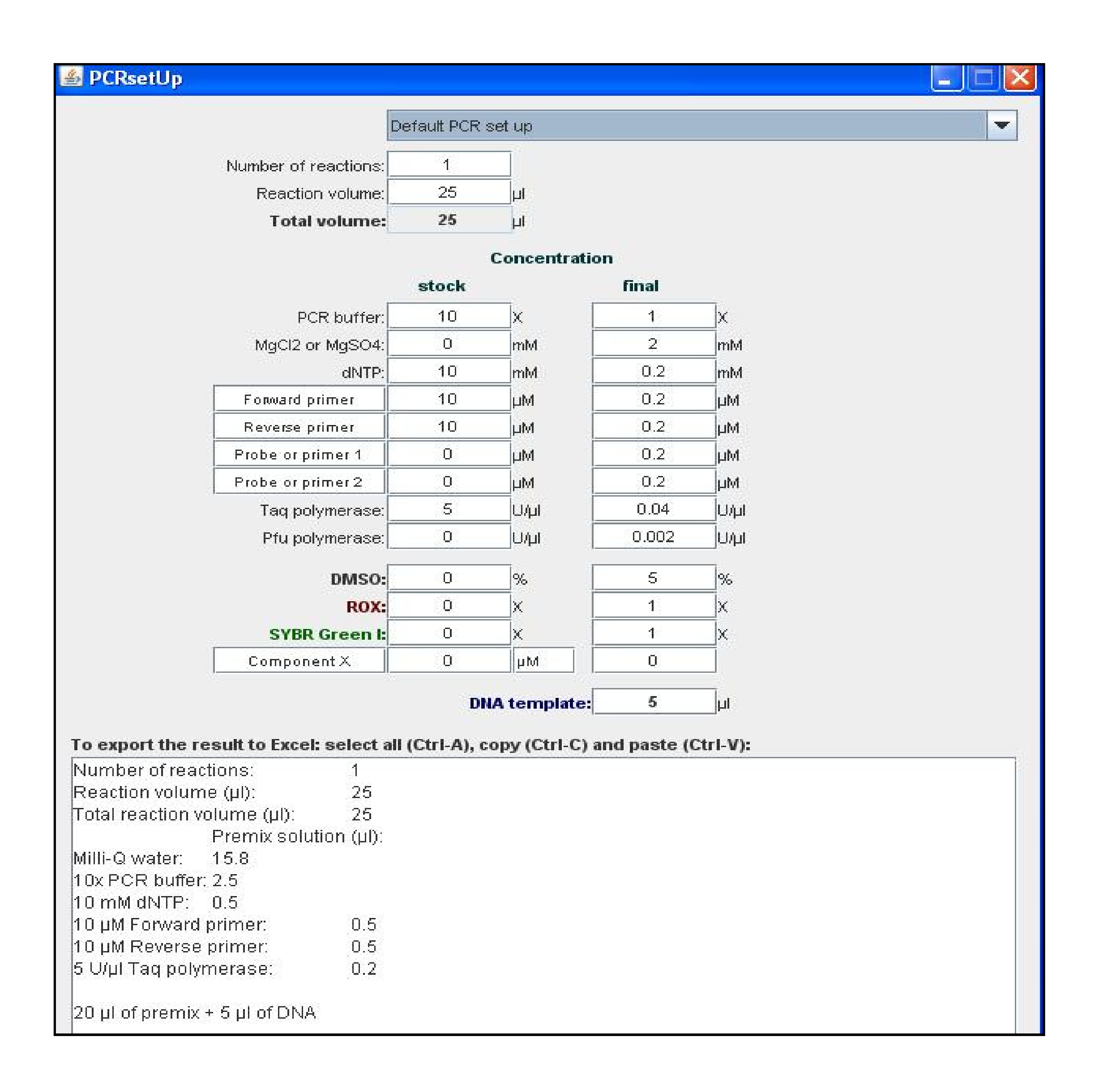
OD_{260} units

Type of nucleic acid measured
- DNA
- RNA
- ssDNA
- Single-Stranded Oligo

Calculate The solution measured contains [ ] µg/ml of nucleic acid.

OD_{260} x conversion factor = µg/ml of nucleic acid

1 OD_{260} Unit = 50µg/ml for dsDNA
1 OD_{260} Unit = 40µg/ml ssRNA
1 OD_{260} Unit = 35µg/ml ssDNA
1 OD_{260} Unit = 20µg/ml for single-stranded oligo


PCRsetUp
Default PCR set up
Number of reactions: 1
Reaction volume: 25 µl
Total volume: 25 µl
Concentration
stock
final
PCR buffer: 10 X 1 X
MgCl2 or MgSO4: 0 mM 2 mM
dNTP: 10 mM 0.2 mM
Forward primer 10 µM 0.2 µM
Reverse primer 10 µM 0.2 µM
Probe or primer 1 0 µM 0.2 µM
Probe or primer 2 0 µM 0.2 µM
Taq polymerase: 5 U/µl 0.04 U/µl
Pfu polymerase: 0 U/µl 0.002 U/µl
DMSO: 0 % 5 %
ROX: 0 X 1 X
SYBR Green I: 0 X 1 X
Component X 0 µM 0
DNA template: 5 µl
To export the result to Excel: select all (Ctrl-A), copy (Ctrl-C) and paste (Ctrl-V):
Number of reactions: 1
Reaction volume (µl): 25
Total reaction volume (µl): 25
Premix solution (µl):
Milli-Q water: 15.8
10x PCR buffer: 2.5
10 mM dNTP: 0.5
10 µM Forward primer: 0.5
10 µM Reverse primer: 0.5
5 U/µl Taq polymerase: 0.2
20 µl of premix + 5 µl of DNA

ENDMEMO

Genome Sequencing Service Sequence your entire Genome with

$159 UV Light Sensors 250-400 nm, Measure UV Filtering, Radiati

PNA: Peptide Nucleic Acid Custom PNA Synthesis, Fmoc Monome

Search ○ Web ⊙ EndMemo

Home » Tools » BioTools » OD260 Calculator

Complete Gene Sequences of Whole Human Genome.

OD260 Nucleotide Concentration Calculator

OD_{260} Value = [ ] Calculate Clear

⊙DNA
○RNA
○ssDNA
○ssOligo

DNA Concentration (µg/ml) = [ ] Calculate Clear

Note: The nucleic acids (DNA, RNA and oligo) solutions with different concentration has different ability aborbing light. When the light wave is 260 nm, the Absorbance of light and the nucleic acid concentration is calculated as:

C = A/(e * l)

PCR Box Titration Calculator

Netscape Navigator version 4 or higher required.

Experiment Title:

Investigator: Date:

	Columns	Rows				
	8	4	Reaction volume: 10 ml		Fudge factor: 10 %	
Titrate	Bottom	Top	Both	Reagent	Stock concentration	Final concentration (highest in titration)
☐	○	○	⊙	buffer	10 X	1 X
☐	⊙	○	○	dNTPs	2000 mM each	200 mM each
☑	⊙	○	○	$MgCl_2$	10 mM	1.5 mM
☐	⊙	○	○	5' primer	10 mM	0.5 mM
☐	⊙	○	○	3' primer	10 mM	0.5 mM
☐	○	⊙	○	red sucrose	5 X	1 X
☑	○	⊙	○	template	10 X	1 X
☐	○	⊙	○	polymerase	5 U/ml	0.05 U/ml
☐	⊙	○	○	additive	100 X	0 X
	⊙	○	○	H_2O		

Done Help!

شكل 37 : بعض الحاسبات المستعملة في تفاعلات الكوثرة

وهناك بعض الحاسبات الخاصة ببعض الشركات مثل شركة Thermo الموضحة في الشكل التالي (شكل 38) والتي يمكن ان تستعمل بشكل رئيس مع منتجاتها .

www.finnzymes.fi/java_applets/reaction_setup_phusion.html

Most Visited | Getting Started | Customize Links | Free Hotmail | Windows Marketplace | Windows Media | Windows

Keywords | Search | Change site .. | Go

Thermo SCIENTIFIC

Finnzymes
PCR & qPCR Products

Part of Thermo Fisher Scientific

HOME | ABOUT | REAGENTS | INSTRUMENTS | PCR VESSELS | RESOURCES | CONTACT

Reaction setup with Phusion® DNA Polymerases

This calculator generates a pipetting table for setting up PCR reactions with Thermo Scientific Phusion® DNA Polymerases.

1. Fill in the volume of template DNA you want to use, the number of PCR reactions you intend to run, and the individual reaction volume.
2. Define if you would like to add some extra volume for pipetting. You can choose between an absolute volume, a number of extra reactions or a presentage of the final volume.
3. Fill in your stock concentrations and the desired final concentrations for primers, dNTPs, (DMSO) and Phusion DNA Polymerase.

The application will automatically calculate the pipetting volumes required for a premix, and the volume of the premix needed for the final reaction.

Volume of DNA template/reaction: 2 µl
Number of reactions: 10
Reaction volume: 50 µl
Total volume: 500 µl

☑ Extra volume
☐ Extra reaction
☐ % of volume
Extra volume: 50 µl

PRODUCTS
Reagents | Instruments | Consumables

QUICK LINKS
› Tm calculator for PCR
› Thermo Scientific DNA polymerases and cloning
› Important instructions on annealing temperature
› What do you think about this calculator?

This application requires Java Virtual Machine
Download Java

	Concentration				Volume (µl)	
	stock		**final**		**per reaction**	**for premix**
Phusion HF or CG buffer*:	5	X	1	X	10	105
Forward primer**:	25	µM	0.5	µM	1	10.5
Reverse primer**:	25	µM	0.5	µM	1	10.5
10 mM dNTPs:	10	mM	0.2	mM	1	10.5
(DMSO***, optional):	100	%	0	%	0	0
Phusion DNA polymerase:	2	U/µl	0.02	U/µl	0.5	5.25
				H_2O:	34.5	362.25
				Premix:	48	504
				Template DNA:	2	µl

* The HF buffer should be used as the default buffer for high-fidelity amplification. The GC buffer can improve the performance of Phusion DNA Polymerase on some difficult or long templates. See more details in the Phusion instruction manuals.
** The recommendation for final primer concentration is 0.5 µM, but it can be varied in a range of 0.2-1.0 µM, if needed.
*** Addition of DMSO is recommended for GC-rich amplicons. DMSO is not recommended for amplicons with very low GC % or amplicons that are >20 kb.

شكل 38 : حاسبات شركة Thermo

برامج تصميم البواديء والتعامل معها

تعج شبكة الانترنيت بالبرامج التي تساعد في تصميم البواديء وكذلك إجراء الحسابات للمؤشرات المطلوبة . وتختلف البرامج في الطرق التي تحسب بها المؤشرات الفيزياوية مثل درجة حرارة الانصهار والالتحام . و بعض البرامج يتخصص بغرض معين وليس إيجاد البواديء العامة .

ومن جهة ثانية يجب التذكر بان التعامل يكون مع زوج من البواديء في تفاعلات الكوثرة التي يجب ان لا يكون الفرق في درجة حرارة الانصهار بينهما اكبر من 5°م ، وكلما كان الفرق اصغر او مساويا للصفر يكون هو الأفضل وذلك لان اختلاف هذه الدرجات يؤثر في كفاءة تفاعل الكوثرة لان البادىء بدرجة انصهار Tm عالية سوف يؤدي الى Mispriming عند درجة الحرارة الواطئة ، والباديء بدرجة انصهار واطئة ربما لا يعمل عند الدرجات الحراريه العالية . وعندما يكون الفرق عاليا يفضل حذف بعض القواعد من البواديء وإعادة الحسابات *In Silico* calculations .

وقد اهتمت بعض الشركات بتوفير حزم من البرامج للتعامل مع البواديء من مختلف الجوانب ومنها

Alkami Biosystems
Molecular Biology Insights
PREMIER Biosoft International
IntelliGenetics Inc
DNA Star
Advanced American Biotechnology and imaging.

فضلا عن ان بعض البرامج تعود الى بعض الجامعات والآخر مصمم من قبل باحثين مطروحة على شبكة الانترنيت .

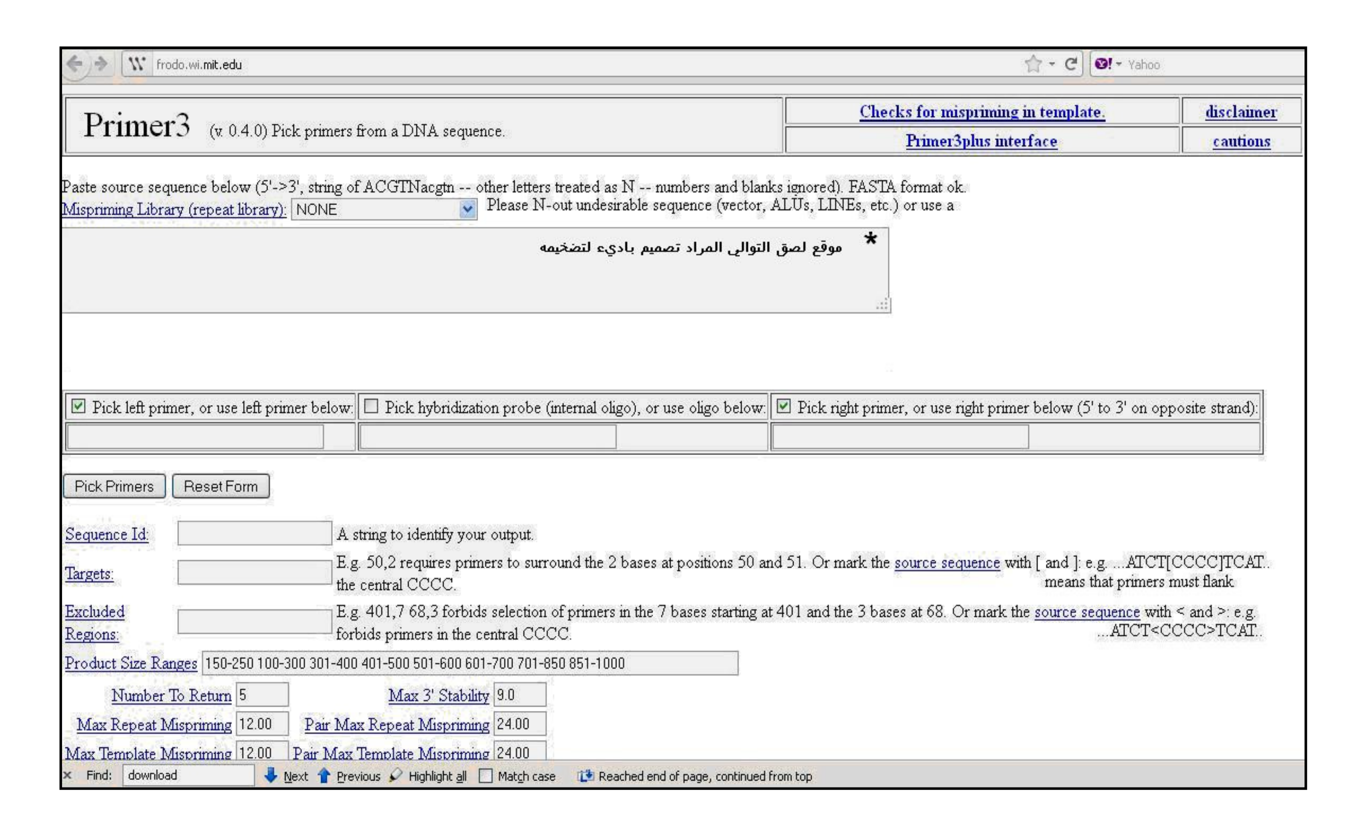
برنامج **Olga**

من أول البرامج التي وضعت للتعامل مع البواديء عام 1990 ويعطي البرنامج تحليل للمكررات المباشرة Direct repeats ، والتراكيب الثانوية ، وإمكانية حدوث مزدوجات البواديء وغيرها من البيانات ولكن استعماله في الوقت الحاضر قليل او لا يستعمل نظرا لوجود برامج أكثر كفاءة .

• برنامج **Primer3**

يعد من أكثر البرامج استعمالا في الوقت الحاضر وذلك لتجاوبه الكبير مع المتطلبات التي يرغب فيها المستخدم عند تصميم البوادىء ويمثل الشكل 37 واجهته ونتائجه . وفيه يلصق التوالي الذي يراد استنباط بوادئ له في المكان المخصص ، ويتم اختيار بعض المؤشرات من واجهة البرنامج ، ثم يطلب التنفيذ لتكون النتائج كما هي موضحة في الشكل (39) الخاصة بإنزيم Adenylate cyclase العائد للخميرة *Saccharomyces cerevisiae* (Acc. No. M77757.1) .

وقد اعتمد البرنامج من قبل NCBI وادخل ضمن الوسائل المعنية بتصميم البوادىء .



```
Primer3 Output
PRIMER PICKING RESULTS FOR gi|171045|gb|M77757.1|YSCAKB Saccharomyces
cerevisiae adenylate kinase 2 gene, complete cds

No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO            start  len   tm    gc%   any   3'         seq
LEFT PRIMER       432   20   60.30  50.00  7.00  3.00 GAGCTGCTGAAACAGCATGA
RIGHT PRIMER      632   20   59.83  50.00  5.00  3.00 TGTGTCATCAAGCCTCTTGG
SEQUENCE SIZE: 1193
INCLUDED REGION SIZE: 1193

PRODUCT SIZE: 201, PAIR ANY COMPL: 6.00, PAIR 3' COMPL: 2.00
  1 ATACACATGTGTAGAAAAGGATAATATACGTATATATATTTGTTTGTAAATCTTTAAATT
 61 TTCAGGAACAGGGTTAGCAAGCATCAATGAAAGCAGACGCGAAACAAATAACACATCTAC
121 TCAAACCTCTTCGACTTTTATTATTGGGGGCTCCAGGGTCAGGTAAAGGGACACAGACTT
181 CGAGATTACTAAAGCAAATTCCACAATTATCTTCAATTTCGTCAGGCGACATTTTACGTC
241 AGGAAATAAAATCTGAATCTACCCTAGGCCGAGAGGCTACTACCTACATTGCTCAAGGCA
301 AGTTATTACCGGATGATCTCATAACGCGTCTGATAACTTTTCGTCTTTCGGCATTGGGTT
361 GGTTAAAACCATCTGCCATGTGGTTGCTCGATGGATTTCCTCGAACTACTGCGCAAGCT
421 CTGCCTTAGACGAGCTGCTGAAACAGCATGACGCCAGCTTGAATCTAGTGGTAGAGCTAG
               >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
481 ATGTACCCGAATCCACCATATTAGAAAGGATCGAGAACAGATATGTTCACGTTCCTAGTG
541 GGAGAGTGTATAACTTACAATATAATCCTCCCAAAGTGCCAGGATTAGACGATATCACCG
601     GAGAACCATTGACCAAGAGGCTTGATGACACAGCGGAAGTGTTTAAAAAAAGGCTAGAAG
                     <<<< <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<

KEYS (in order of precedence):
>>>>>> left primer
<<<<<< right primer
  بوادىء اضافية     start  len   tm    gc%   any   3'         seq
 1 LEFT PRIMER       378   20   60.35  45.00  4.00  1.00 ATGTGGTTGCTCGATGGATT
   RIGHT PRIMER      582   20   60.07  50.00  3.00  2.00 CTGGCACTTTGGGAGGATTA
   PRODUCT SIZE: 205, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

 2 LEFT PRIMER       380   20   60.47  50.00  4.00  2.00 GTGGTTGCTCGATGGATTTC
   RIGHT PRIMER      582   20   60.07  50.00  3.00  2.00 CTGGCACTTTGGGAGGATTA
```

شكل 39 : واجهة البرنامج Primer3 ونتائجه

وتتضمن واجهة النتائج القيم الإحصائية .

- **برنامج Autoprime**

من البرامج التي تعتمد أساسا على البرنامج Primer3 يستعمل لتصميم بوادىء خاصة بالكوثرة الآنية RT-PCR لقياس التعبير الجيني في الخلايا حقيقية النواة بعد انتخاب المدخلات الملائمة للبرنامج ، أي ان البوادىء تصمم للـ cDNA الناتج من mRNA ، في البرنامج خيارات ومتغايرات كثيرة لضمان جودة البوادىء المصممة ، والواجهة موضحة في الشكل الآتي (شكل 40) :

autoprime

Basic parameters (المدخلات المستعملة)

Parameter	Value	Unit / example
Gene Symbol		eg APOM
ENSEMBL identifier		eg ENSG00000111964
ENSEMBL transcript id		eg ENSMUST00000025846
Organism	Homo sapiens	
Salt concentration	50	mM
Primer concentration	300	nM
Optimal primer TM	60	°C
Primer length	21	nucleotides
Output format (خيارات المخرجات)	HTML	

Specific AutoPrime parameters (خيارات لزيادة الدقة في البوادئ المصممة)

Parameter	Value	Unit
Exclude genomic mispriming	☑	
Exclude mispriming on rep. Elements	☑	
Search for internal primers	☐	
Find internal hybridization oligo	☐	
Shift on exon border	4	nucleotides

Internal oligo options (خيارات اخرى)

Parameter	Value	Unit
Hybprobe concentration	50	nM
Optimal hybprobe length	20	nucleotides
Minimal hybprobe length	18	nucleotides
Maximal hybprobe length	27	nucleotides
Optimal hybprobe TM	57	°C
Minimal hybprobe TM	57	°C
Maximal hybprobe TM	63	°C
Minimal hybprobe GC content	20	%
Maximal hybprobe GC content	80	%
Maximal hybprobe hairpin score	12	
Maximal mononucleotide repeats	5	nucleotides
Maximal hybprobe alignment score	12	

Extended Primer3 settings (شروط وخيارات Primer3)

Parameter	Value	Unit
Minimal primer length	18	nucleotides
Maximal primer length	27	nucleotides
Minimal primer TM	53	°C
Maximal primer TM difference	3	°C
Maximal primer TM	67	°C
Minimal primer GC content	30	%
Maximal primer GC content	70	%
Primer GC clamp	1	nucleotides
Maximal hairpin score	8	
Maximal primer alignment score	3	
Maximal mononucleotide repeats	3	nucleotides
Maximal end homology	9	
Product size	50-150	nucl.
Optimal product TM	0	°C
Maximal product TM	90	°C
Minimal product TM	60	°C
Maximal mispriming score	12	
Maximal summed mispriming score	24	

شكل 40 : واجهة واختيارات البرنامج Autoprime

- برنامج **Primer3plus**

وهو برنامج مطور من البرنامج السابق (Primer3) ويوضح الشكل 41 واجهة البرنامج والإمكانات الإضافية .

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

Primer3Manager | Help
About | Source Code

Task: Detection — Select primer pairs to detect the given template sequence. Optionally targets and included/excluded regions can be specified. — Pick Primers — Reset Form

Main | General Settings | Advanced Settings | Internal Oligo | Penalty Weights | Sequence Quality

Sequence Id:

Paste source sequence below — Or upload sequence file: Browse... Upload File

لصق التواليات

Mark selected region: <> [] {} Clear — Save Sequence

خيارات اضافية

Excluded Regions: < >
Targets: [ ]
Included Region: { }

Pick left primer or use left primer below. | Pick hybridization probe (internal oligo) or use oligo below. | Pick right primer or use right primer below (5'->3' on opposite strand).

Primer3Plus pick primers from a DNA sequence	Primer3Manager	
		http://sourceforge.net/projects/primer3/

Pair 1:

Left Primer 1: Mycoplasma_F

Sequence: GTTTGTGGTTTTGCATGCTC

Start: 565	Length: 20 bp	Tm: 59.2 °C	GC: 45.0 %	ANY: 6.0	SELF: 2.0

Right Primer 1: Mycoplasma_R

Sequence:	GCTGTCAAAGGCGTTGATTT				
Start: 722	Length: 20 bp	Tm: 60.3 °C	GC: 45.0 %	ANY: 7.0	SELF: 1.0
Product Size: 158 bp		Pair Any: 4.0	Pair End: 0.0		

1	GCTTGTGTGA CAACAACTAG AATTAAAATA GGGAGGTAAA TTCATTGTCC
551	TTTGATAAGC AATTGTTTGT GGTTTTGCAT GCTCATCTAA GTTGTATGTA
601	TAGGTATTAT TTGCTATATC AAATTTTGTG AAATTAGTTG TAGGTAATAA
651	TTGTTTTATA GTGTTGGCAT AACTTGTCAA GGTTTTAAAG TCATTTGCAT
701	CGAAATCAAC GCCTTTGACA GCCTCAAATT TATTAATTAG AGCTTCTAAC
751	TTACCATCTT TAAATTGATC TAAAGTTAGT ATTTTGTTAT AAATGGATTG

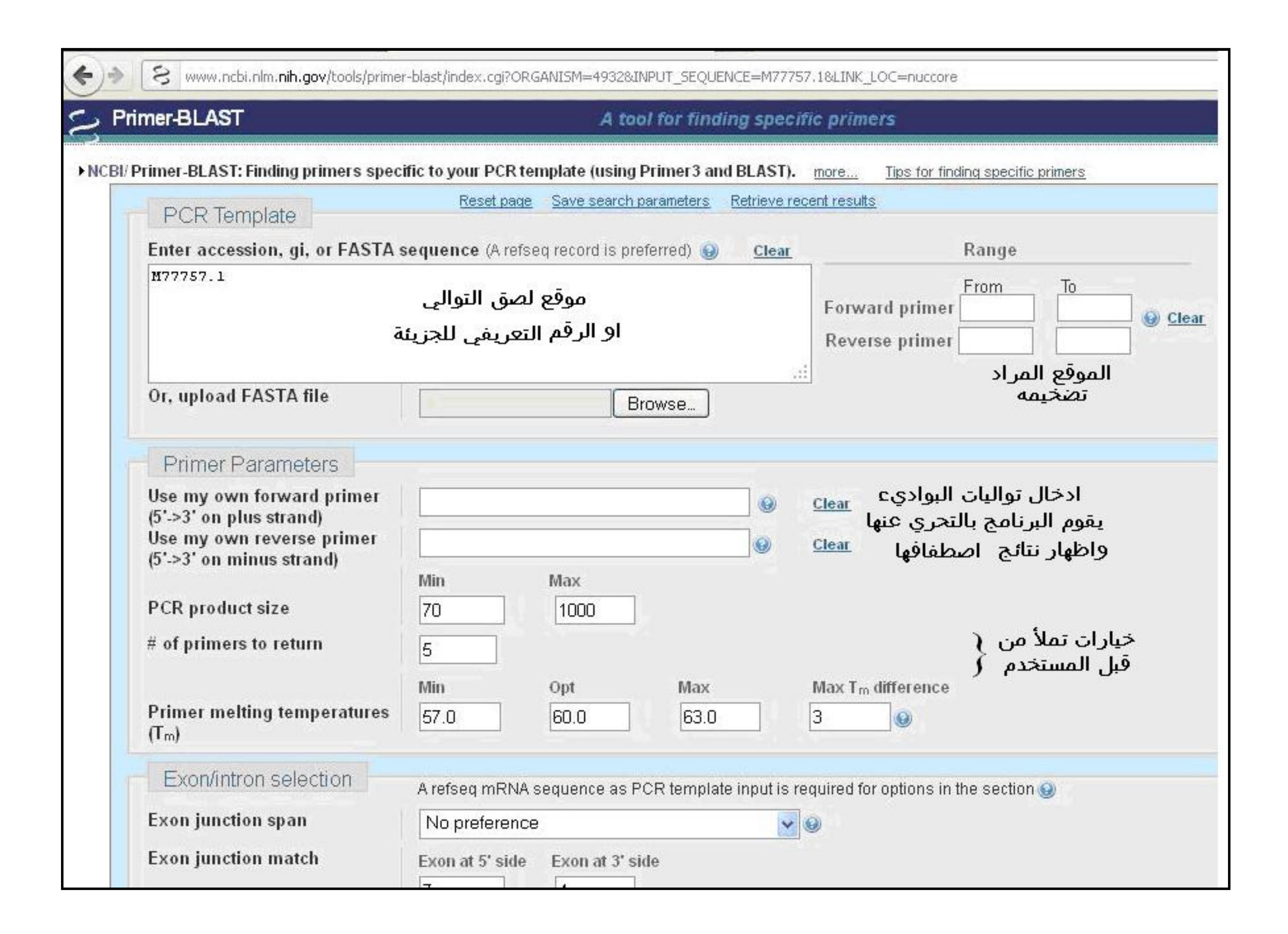
Pair 2:

☐ Left Primer 2:	Mycoplasma_1_F				
Sequence:	TTGCGCTTTACTGAATTTGC				
Start: 1706	Length: 20 bp	Tm: 59.1 °C	GC: 40.0 %	ANY: 4.0	SELF: 2.0
☐ Right Primer 2:	Mycoplasma_1_R				
Sequence:	GCTGCAAGAAGAGCAAAAGG				
Start: 1935	Length: 20 bp	Tm: 60.3 °C	GC: 50.0 %	ANY: 4.0	SELF: 0.0
Product Size: 230 bp		Pair Any: 6.0	Pair End: 3.0		
Primer Pair:	considered 1549, unacceptable product size 1527, high end compl 2, ok 20				

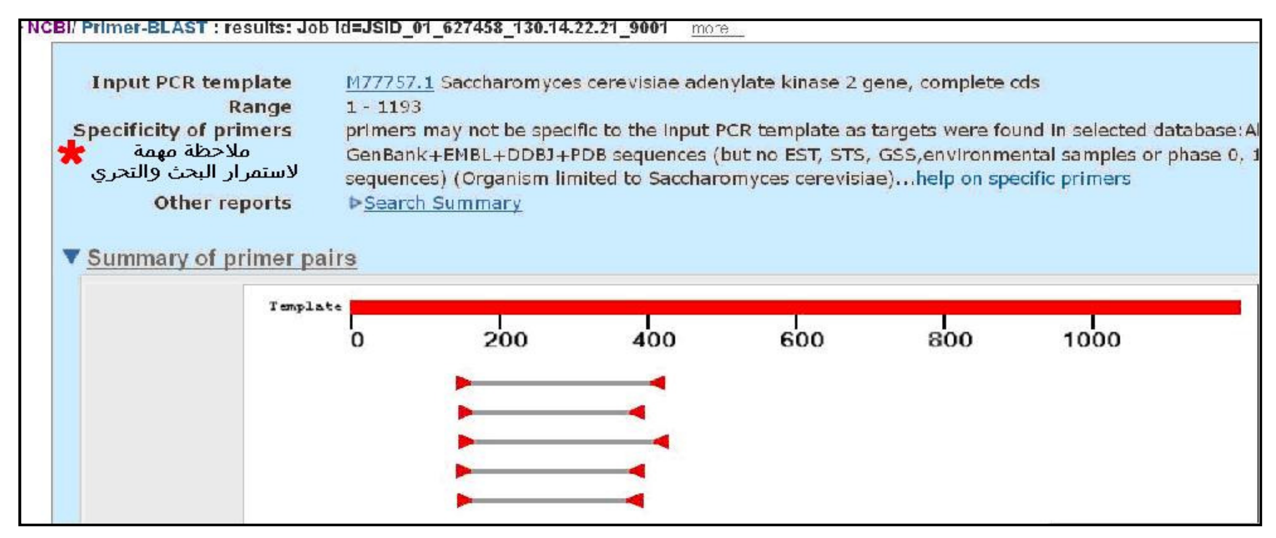
شكل 41 : واجهة برنامج Primer3plus ونتائجه لإحدى التواليات

• **برنامج Primer-BLAST**

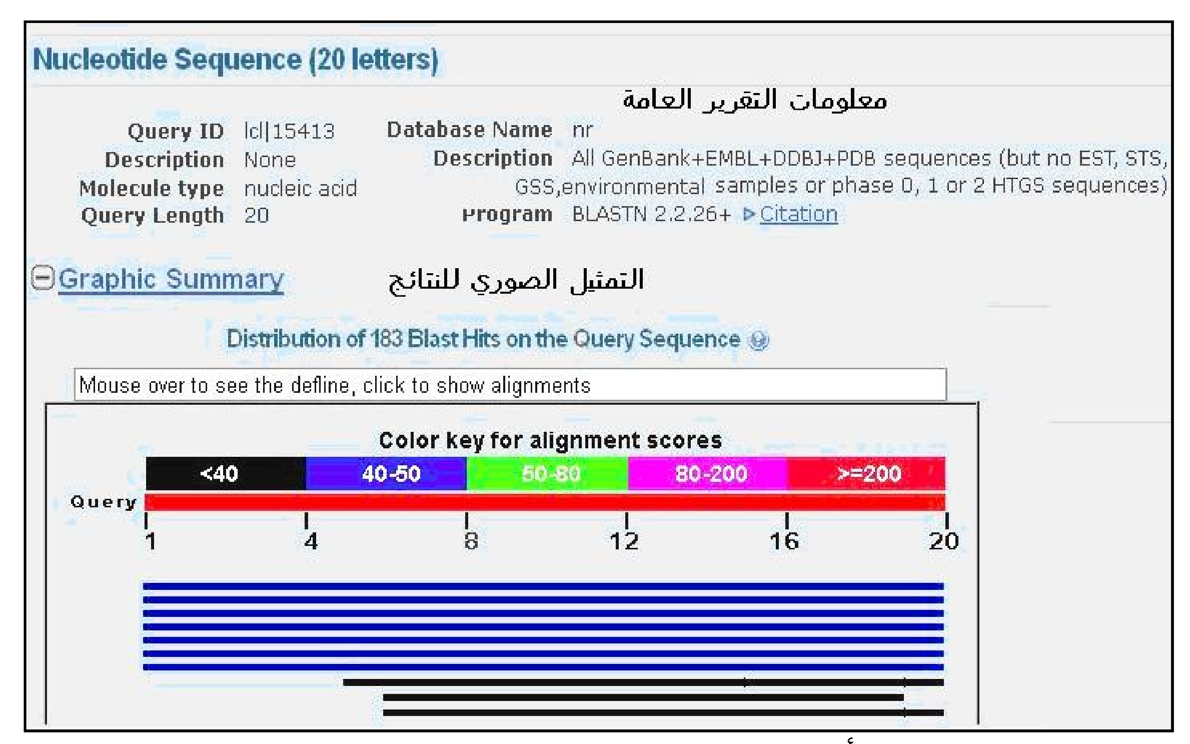
استغل برنامج Primer3 بشكل جيد وربط من قبل مركزNCBI (**N**ational **C**enter for **I**nformation **B**iotechnology) مع برنامج BLAST ليكون أداء البرنامج متشعب نظرا لربطه مع قواعد البيانات المنضوية تحت NCBI . وواجهة البرنامج ونتائجه موضحة في الشكل 42 .



وتجد خيارات أخرى اعتمادا على الجزيئة المراد تصميم باديء لها والغرض من التجربة ومجمل النتائج تظهر كالآتي .



اما نتائج التطابق باستعمال BLAST N الإصدار الخاص بالتواليات القصيرة BLAST N 2.2.26+ فتظهر كالآتي :



التقرير النصي لنتائج التأكد هو كالاني :

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
BK006939.2	TPA: TPA_inf: Saccharomyces cerevisiae S288c chromosome V, complet	40.1	80.8	100%	3e-04	100%
FN393067.1	Saccharomyces cerevisiae EC1118 chromosome V, EC1118_1E8 genomic	40.1	80.8	100%	3e-04	100%
U18922.1	Saccharomyces cerevisiae chromosome V cosmids 9163 and 9132	40.1	60.5	100%	3e-04	100%
X65126.1	S.cerevisiae PAK3 gene for adenylate kinase	40.1	40.1	100%	3e-04	100%
K03293.1	Yeast (S.cerevisiae) RAD3 gene, complete cds	40.1	40.1	100%	3e-04	100%
M77757.1	Saccharomyces cerevisiae adenylate kinase 2 gene, complete cds	40.1	40.1	100%	3e-04	100%
X02368.1	Yeast RAD3 gene for excision of pyrimidine dimers	40.1	40.1	100%	3e-04	100%
BK006945.2	TPA: TPA_inf: Saccharomyces cerevisiae S288c chromosome XII, compl	26.3	170	75%	5.1	100%
NM_001182026.1	Saccharomyces cerevisiae S288c Sls1p (SLS1), mRNA	26.3	26.3	65%	5.1	100%
FN393078.1	Saccharomyces cerevisiae EC1118 chromosome XII, EC1118_1L10 genor	26.3	107	70%	5.1	100%
AY692902.1	Saccharomyces cerevisiae clone FLH158385.01X YLR139C gene, complet	26.3	26.3	65%	5.1	100%
X91258.1	S.cerevisiae DNA from chromosome XII right arm including ACE2, CKI1, P	26.3	26.3	65%	5.1	100%
Z73311.1	S.cerevisiae chromosome XII reading frame ORF YLR139c	26.3	26.3	65%	5.1	100%
U53881.1	Saccharomyces cerevisiae chromosome XII cosmid 9606	26.3	26.3	65%	5.1	100%
Z48452.1	S.cerevisiae SLS1 gene	26.3	26.3	65%	5.1	100%
NM_001183109.2	Saccharomyces cerevisiae S288c Bni1p (BNI1), mRNA	24.3	24.3	60%	20	100%
BK006947.3	TPA: TPA_inf: Saccharomyces cerevisiae S288c chromosome XIV, compl	24.3	105	95%	20	100%
BK006938.2	TPA: TPA_inf: Saccharomyces cerevisiae S288c chromosome IV, comple	24.3	211	100%	20	100%
NM_001180525.1	Saccharomyces cerevisiae S288c Rad9p (RAD9), mRNA	24.3	24.3	60%	20	100%
FN393086.1	Saccharomyces cerevisiae EC1118 chromosome XIV, EC1118_1N9 genom	24.3	64.9	80%	20	100%
FN393074.1	Saccharomyces cerevisiae EC1118 chromosome IX, EC1118_1I12 genom	24.3	44.6	60%	20	100%

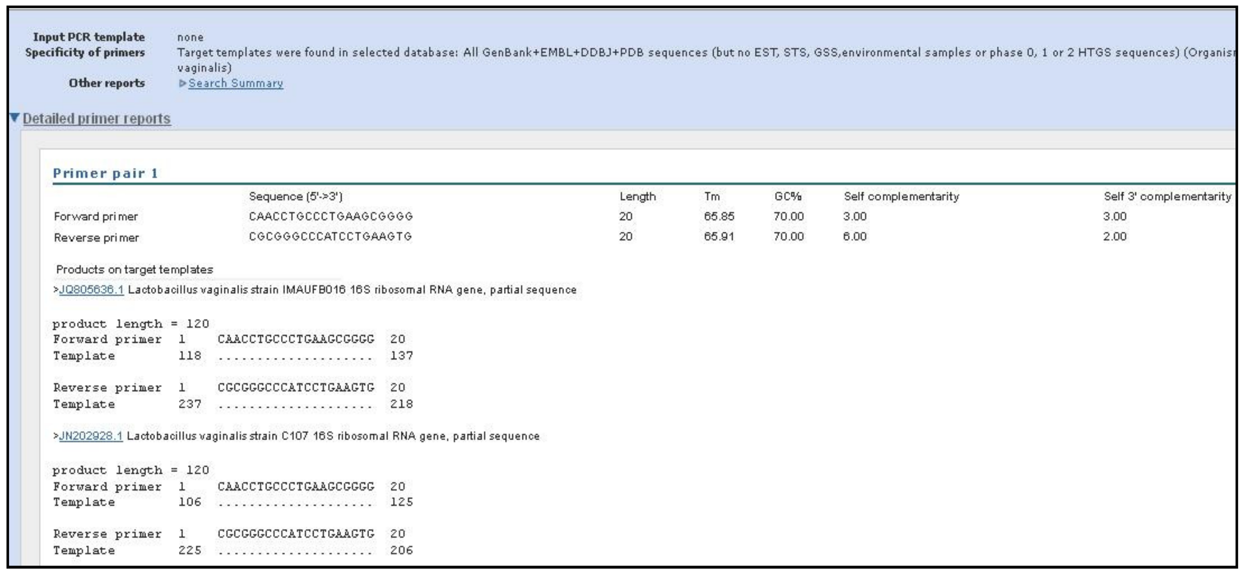
شكل 42 : واجهة البرنامج Primer-BLAST ومخرجاته الصورية وعمليات التأكد من البادىء الصورية والنصية

واستعمل البرنامج في إيجاد البوادىء لجين خميرة الخبز ذو رقم التسجيل (M77757.1) السالف الذكر وتم اختيار قاعدة البيانات الأصغر والمشذبة والمنقحة (nr) . ويفضل اختيار اسم الكائن الحي لانها ستعطي نتائج أكثر انضباطا وعندها لا حاجة لاختيار قاعدة بيانات (nr) . ويمكن باستعمال واجهة البرنامج اختيار قطعة الجين المراد تضخيمها وذلك بتحديد المواقع في النوافذ في الجهة العليا اليمنى . والبرنامج يقبل التوالي بصيغة FASTA او ذكر رقم التسجيل Accession number كما موضح في الشكل أعلاه (39) .

وفي حالة إدخال رقم تسجيل لجزيئات mRNA فان البرنامج آليا يصمم بوادئ لجزيئات DNA الخاص به الذي يكون له تغايرات في مواقع الفلق Spliced variants .

ويقوم البرنامج بإعطاء خمسة بوادئ عند استخدام إعداداته الأساسية (Default settings) وبتغير الإعدادات يمكن الحصول على أعداد أكثر من البوادىء .

وفي بعض الأحيان يمكن استعمال البوادئ المصممة أصلا مع المواصفات المطلوبة ولصقها بالنوافذ الخاصة بها والبرنامج سيقرر مدى صلاحيتها كما موضح في الآتي شكل 43 :



شكل 43 : عمليات التأكد من البوادئ عند استعمال Primer-BLAST

ومثل ما ذكر آنفا عندما تكون الغاية هي العموم تستعمل قاعدة (nr) ولكن عندما يراد التخصيص أكثر يدخل اسم الكائن . واستعمال القاعدة الأصغر التي يحتمل ان تكون حاوية على تواليات الهدف Target sequence .

ومن باب التخصيص الذي يوفره البرنامج إمكانية إيجاد البوادئ للاكسونات ومناطق التقاء الاكسونات مع الانترونات Exon/Intron junction في الأحياء حقيقية النواة وعندها تملئ النوافذ الخاصة بالبرنامج والموضحة في الشكل أعلاه .

ومن البرامج الفرعية ضمن برنامج Primer-BLAST والتي تستعمل لأغراض خاصة هي واجهات تختص بتصميم البوادئ لمواضع التغايرات بنيوكليوتيد منفرد Single nucleotide polymorphisms (SNPs) والتي ترتبط بقاعدة بيانات dbSNP وتشكيلاتها الخاصة وأرقام التصنيف الخاصة بها والواجهة موضحة في الشكل 44 (http://pcrsuite.cse.ucsc.edu/SNP_Primers.html) .

SNP Primers - Input form for Primer3

Back to index

This is an input form for creating primers around SNPs in genomic DNA. The program will design primers around all the SNPs, except for the ones of which the position is 'ambiguous'. For primer design, the Primer3 program is used. You can change the default settings below. The input file is a GenBank sequence.

Select the GenBank file that contains your SNPs [Browse...] How to obtain a GenBank file

Product Size Range 250-450 Specify the minimum and maximum size of your product.

هذه تملأ بملف حاوي
على التغاير مثل ....rs
المخزونة في قاعدة البيانات
dbSNP لمختلف SNPs الموجودة

[Pick Primers] [Reset Form]

General Primer Picking Conditions

Primer Size Min: 18 Opt: 20 Max: 23

Primer Tm Min: 55.0 Opt: 60.0 Max: 65.0 Max Tm Difference: 5.0

Primer GC% Min: 30.0 Max: 70.0

Max Self Complementarity: 6.00 Max 3' Self Complementarity: 3.00

CG Clamp: 1 Max Poly-X: 4

شكل 44 : الواجهة الخاصة بإيجاد SNPs

وأخرى خاصة بالبوادىء المتداخلة شكل 45
(http://pcrsuite.cse.ucsc.edu/Overlapping_Primers.html)

Overlapping Primersets - Input form for Primer3

This is an input form for creating overlapping PCR products in large sequences. Just paste your sequence below and select the minimum and maximum overlap. For primer design, the Primer3 program is used. You can change the default settings below.

Sequence:

وضع التوالي المستهدف

Target — Which region of the sequence above needs to be covered? use the format "start location", "length of target", eg 50,100

Product Size Range 250-450 — Specify the minimum and maximum size of your product.

Overlap Size Range 40-90 — What is the minimum and maximum size of the overlap between products? (This is **including** the primers)

[Pick Primers] [Reset Form]

General Primer Picking Conditions - you don't need to change these, but you can

Primer Size Min: 18 Opt: 20 Max: 23

Primer Tm Min: 55.0 Opt: 60.0 Max: 65.0 Max Tm Difference: 5.0

Primer GC% Min: 30.0 Max: 70.0

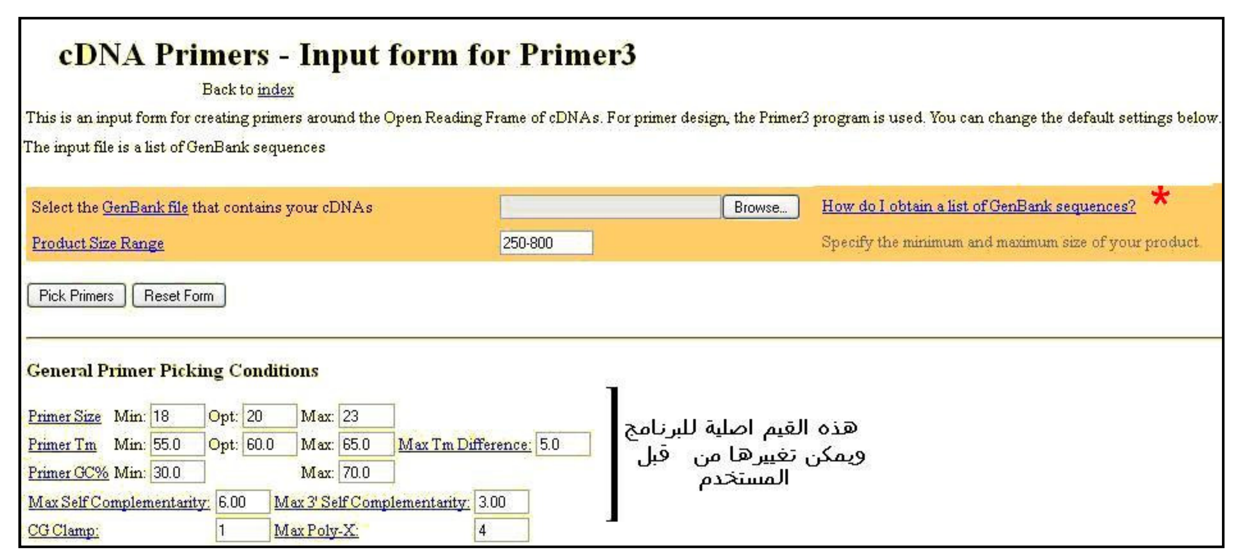
Max Self Complementarity: 6.00 Max 3' Self Complementarity: 3.00

CG Clamp: 1 Max Poly-X: 4

هذه قيم Default للبرنامج
وهي قابلة للتغيير من قبل
المستخدم

شكل 45 : الواجهة الخاصة بإيجاد البوادىء المتداخلة

وبرنامج خاص بالتقاط البوادىء لجزيئات cDNA شكل 46 (http://pcrsuite.cse.ucsc.edu/cDNA_Primers.html)



شكل 46 : الواجهة الخاصة بإيجاد البوادىء الخاصة بـ cDNA

* يوفر البرنامج إمكانية إيجاد تواليات cDNA اما باستعمال Entrez-gene ID او أي صفة تعريفية اخرى للقطع المطلوبة . او بالطريق غير المباشر باستعمال BLAST للتوالي المتوفر وهذا سيؤدي الى التعريف بالتوالي واين يوجد . او باستعمال UniGene cluster الموجودة في NCBI UniGene التي يمكن الحصول عليها مباشرة او عن طريق BLAST أي بطريق غير مباشر . او باستعمال قاعدة البيانات Ensemble في الموقع الأوربي EMBL أي استعمال Ensemble ID .

وأخرى خاصة بجزيئات DNA الجينومي شكل 47
. (http://pcrsuite.cse.ucsc.edu/Genomic_Primers.html)

Genomic Primers - Input form for Primer3

Back to index

This is an input form for creating primers around exons in genomic DNA. For primer design, the Primer3 program is used. You can change the default settings below.
The input file is a GenBank sequence.

Select the GenBank file that contains your gene	Browse...	How to obtain a GenBank file
Gene name		Please use the name as it appears in the file, eg MAPT instead of mapt or tau
Flanking Size	40	Specify the minimum length of sequence flanking each exon
Product Size Range	250-450	Specify the minimum and maximum size of your product.

Pick Primers | Reset Form

General Primer Picking Conditions

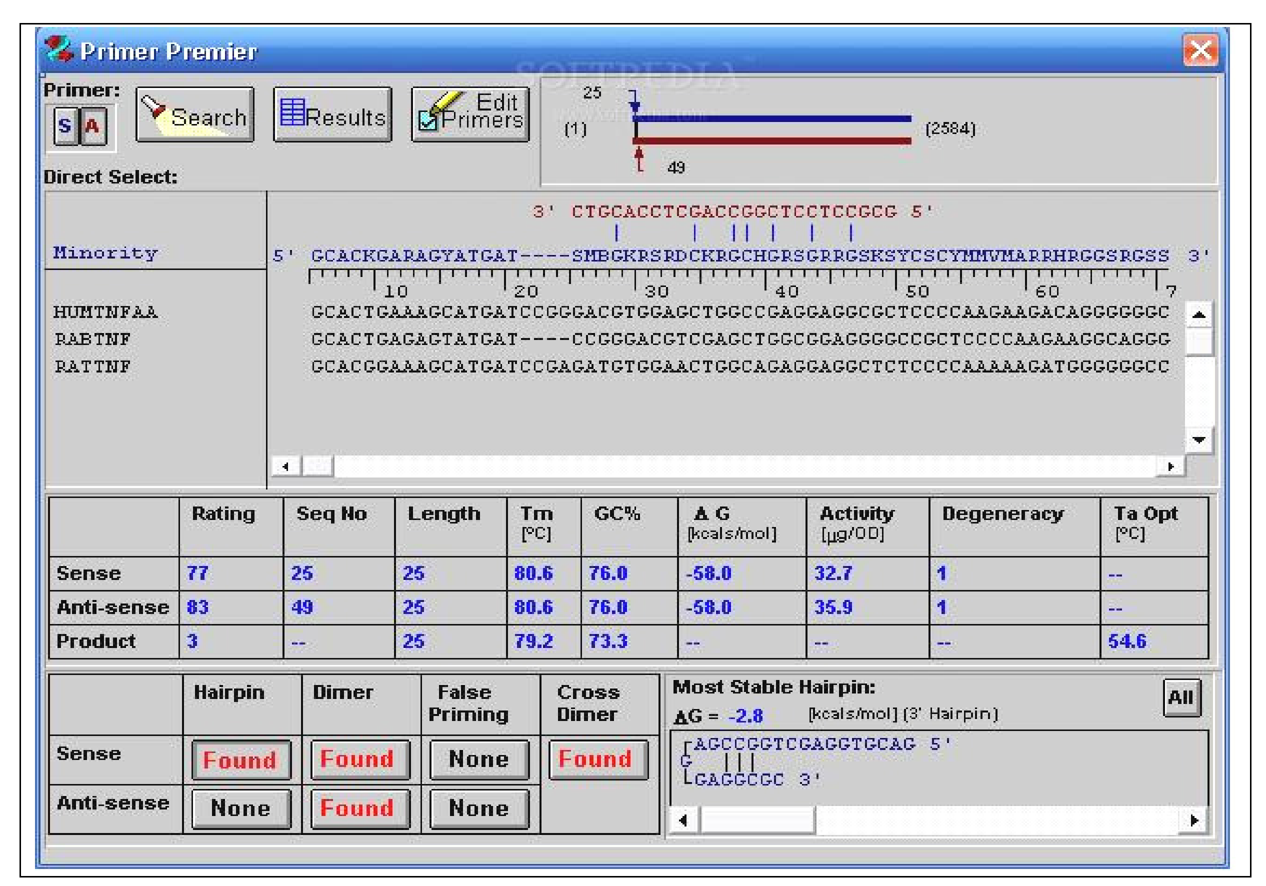
Primer Size Min: 18 Opt: 20 Max: 23
Primer Tm Min: 55.0 Opt: 60.0 Max: 65.0 Max Tm Difference: 5.0
Primer GC% Min: 30.0 Max: 70.0
Max Self Complementarity: 6.00 Max 3' Self Complementarity: 3.00
CG Clamp: 1 Max Poly-X: 4

شكل 47 : الواجهة الخاصة بإيجاد البوادىء الخاصة بالـــ DNA الجينومي

وتتوفر بالبرنامج إمكانية تغيير المؤشرات كما ذكر في البرامج السابقة . وكذلك يوفر البرنامج رابط للمساعدة في الحصول على تواليات الجزيئات كما ذكر أعلاه .
وهذه تكون بمثابة برامج ذات واجهات منفصلة . ولكن موقع NCBI يوفر فرصة الحصول على البوادىء من الموقع نفسه التي تظهر مع التواليات ضمن فعالية Pick primer وهذه الحالة تسهل التقاط البوادىء التي قد تحتاج الى خطوات إضافية عند سلوك غير هذا الطريق .

- **برنامج Primer premier**

من البرامج الذي يوفر الكثير من المعلومات اي انه لا يقوم بتصميم البوادىء فقط وانما يقوم بدراسة البوادىء وإعطاء العديد من البيانات عنها بعد إدخال التواليات في المكان المخصص كما موضح في الشكل 48 .

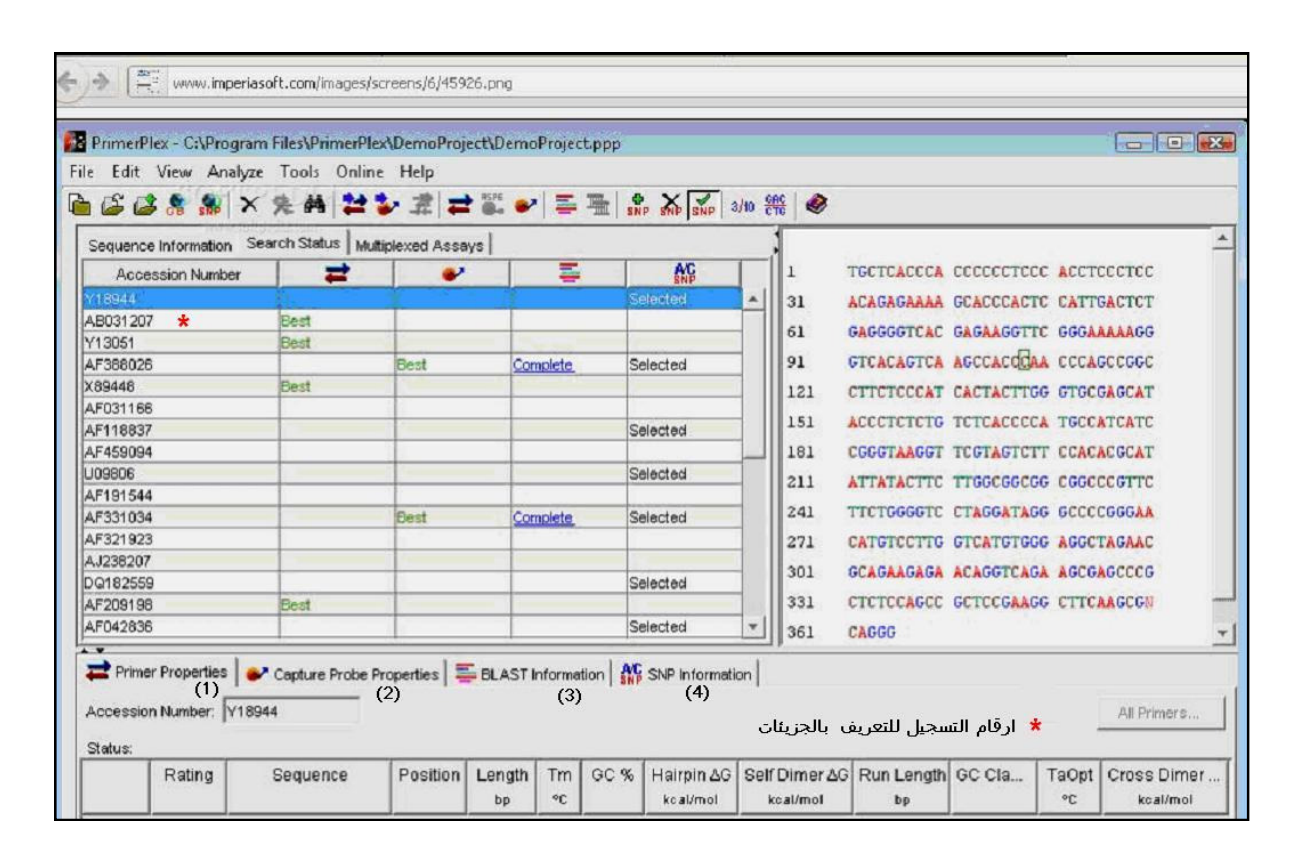


شكل 48 : واجهة برنامج Primer premier

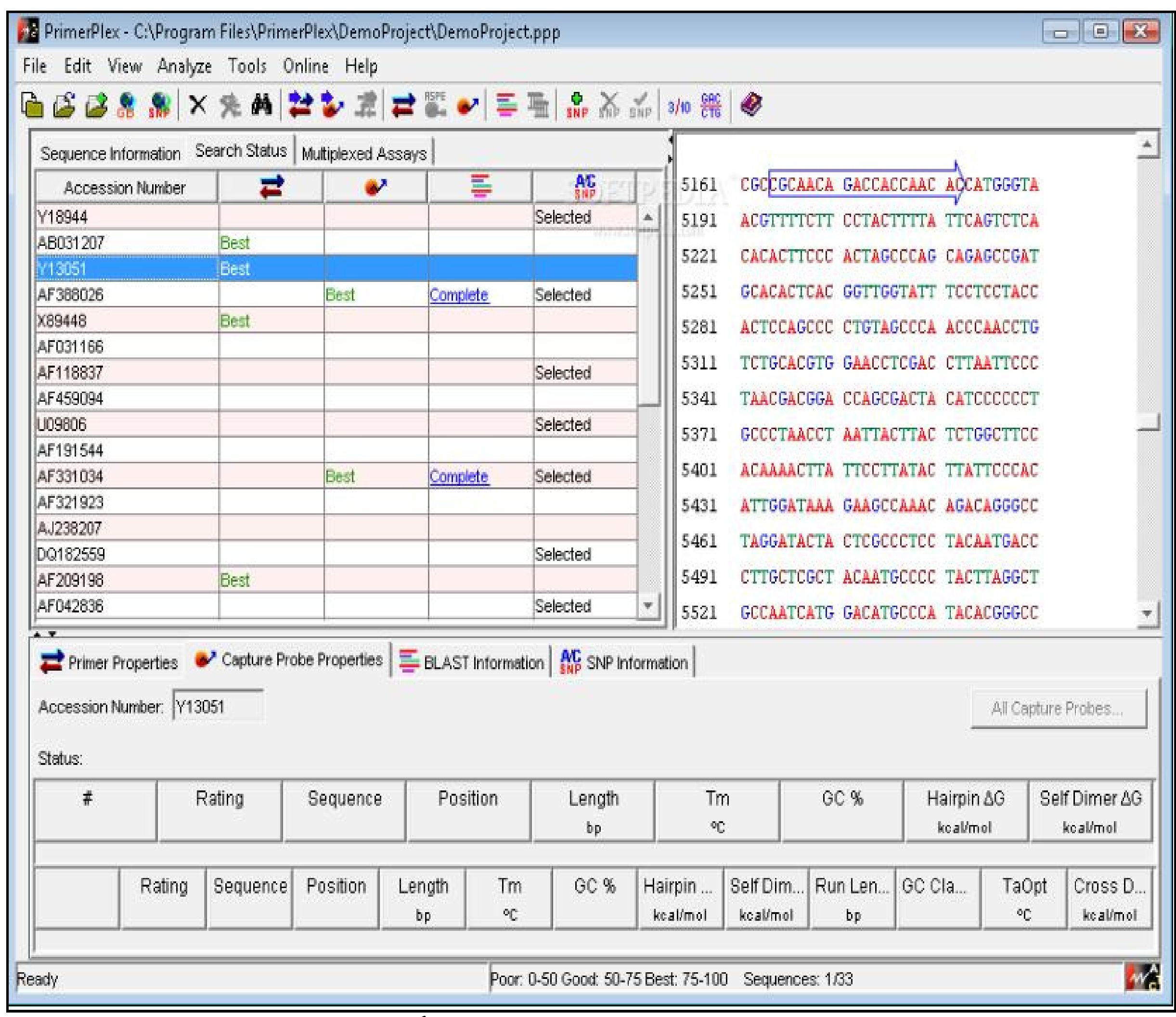
والبرنامج مصمم استنادا الى الأسس العامة المذكورة في تصميم البوادىء ويمكن ان يستعمل في إجراء الاصطفافات ، وكذلك تصميم البوادىء المذكورة آنفا ، وكذلك تصميم البوادىء المشتقة Degenerate primers وتحليل وإيجاد مواقع القطع بالإنزيمات القاطعة وتحليل المتجاورات Contigs أثناء تحديد التواليات بطريقة التشظية Shotgun . وكذلك يستعمل في تحديد بوادئ تستعمل في qPCR ، وبوادىء خاصة بتفاعل الكوثرة المتعدد Multiplex ، وتصميم بوادئ خاصة بأنواع محددة من الأحياء .

• برنامج **PrimerPlex**

البرنامج يعمل أساسا باستعمال رقم التسجيل Accession number اي انه يكون متخصص بالتواليات المسجلة في NCBI والمسجلة في قاعدة بياناته ، وعند تأشير الجزيئة يظهر تواليها ثم بعد ذلك يتم اختيار البادىء ، ويوفر البرنامج إمكانيات كثيرة والواجهة موضحة في الشكل 49 مع طريقة إظهاره للبوادىء .



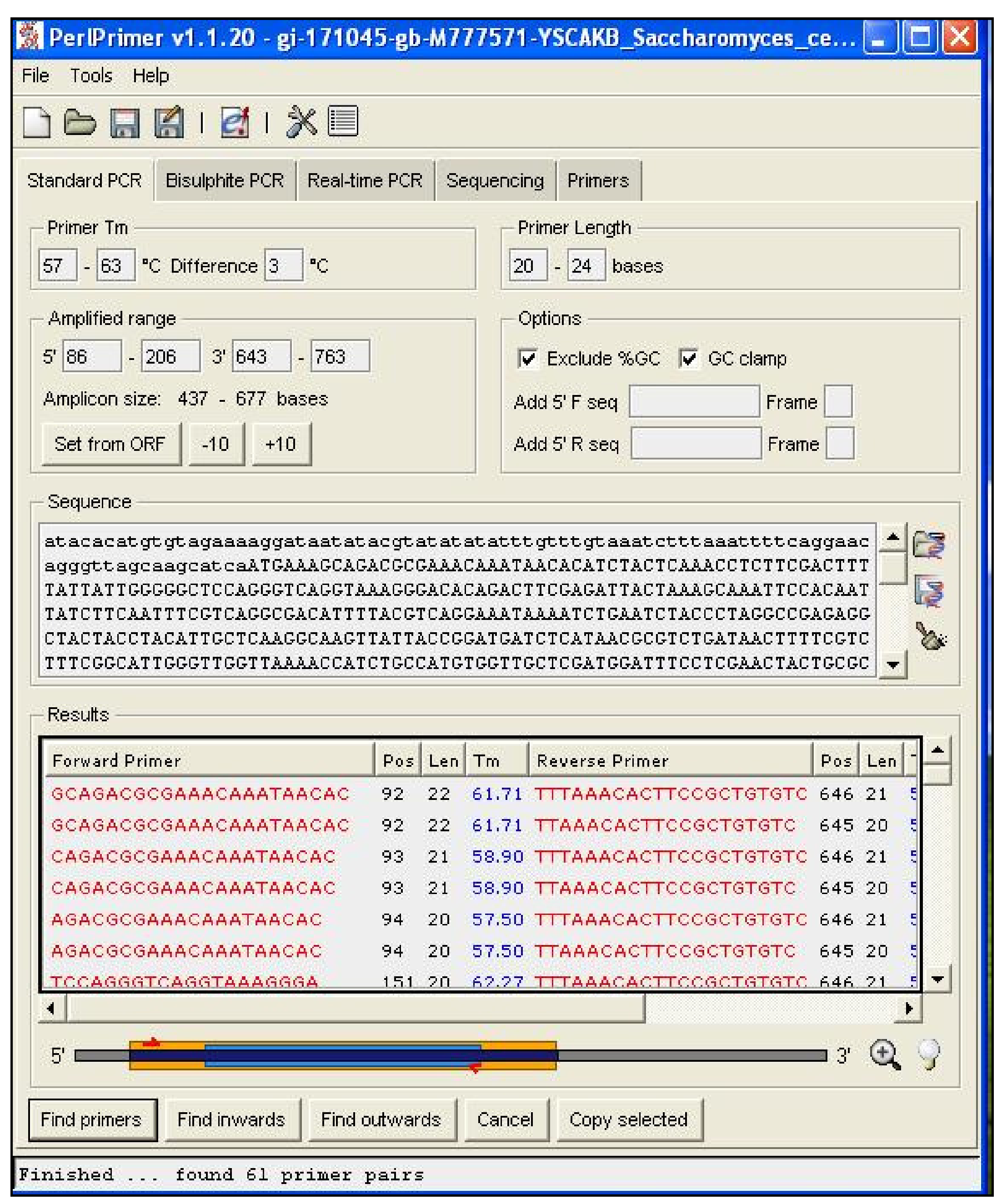
ويلاحظ من الواجهة ان البرنامج فضلا عن إعطائه لمواصفات البوادىء (التي تظهر في الشكل اللاحق) (1) وما يمكن ان يظهر من ماشات الشعر والمزدوجات والطاقة المرفقة ، فهو يمكن ان يصمم المجسات (2) ، وكذلك إمكانية إجراء عمليات الاصطفاف BLASTing (3) ، وكذلك البيانات في حالة احتواء التوالي على SNPs (4) .



شكل 49 : واجهة البرنامج PrimerPlex وطريقة أطهاره للبواديء المنتخبة

• برنامج **PerlPrimer**

من البرامج الملائمة لإيجاد البوادىء لعـدد مـن التواليـات ، والشـكل التـالي (شـكل 50) يوضح استعمال التوالي الخـاص بجـين خمـيرة الخبـز ذو رقـم التسـجيل Accession No. M77757.1 ويظهر الشكل إمكانية إيجاد حوالي 60 بادئ وتوالي كل من البادىء الأمامي والعكسي ومؤشرات أخرى ومن بين البوادىء يمكن اختيار الملائم للمؤشرات المطلوبة .



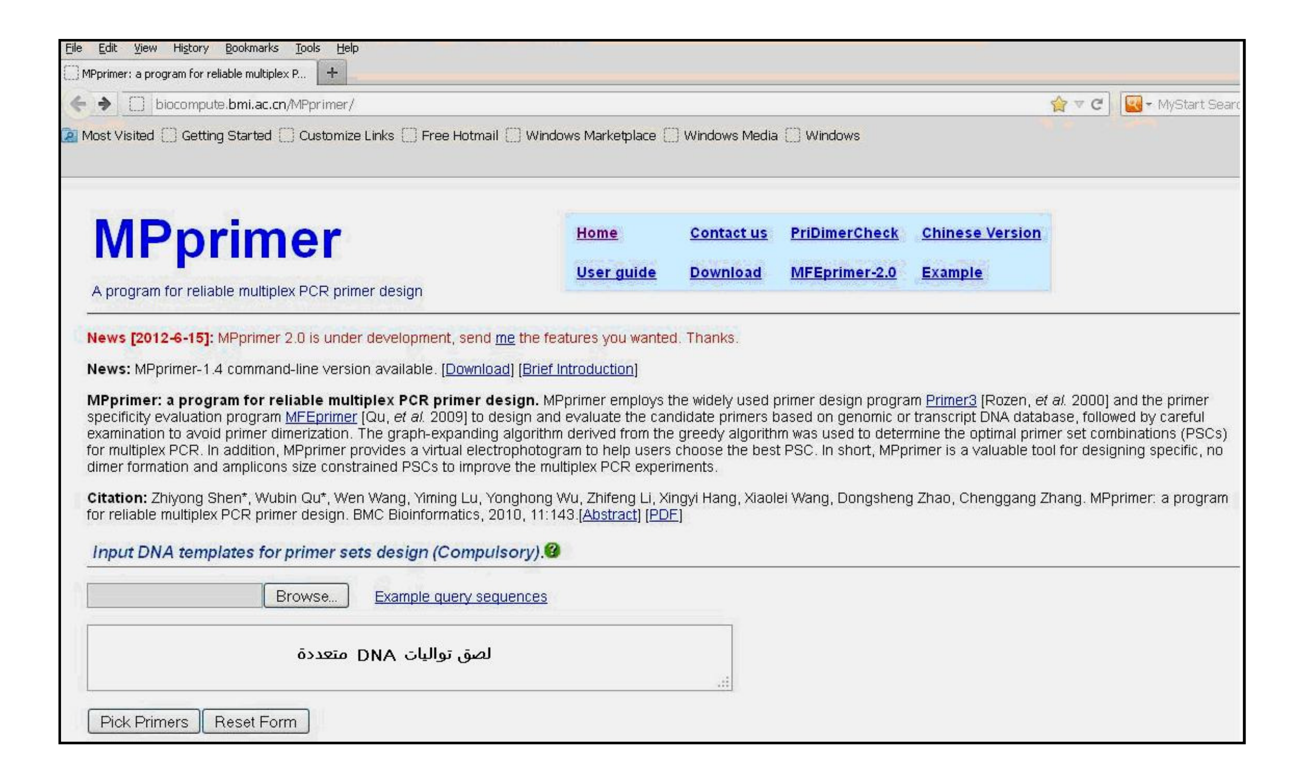
شـكل 50 : برنامج PerlPrimer

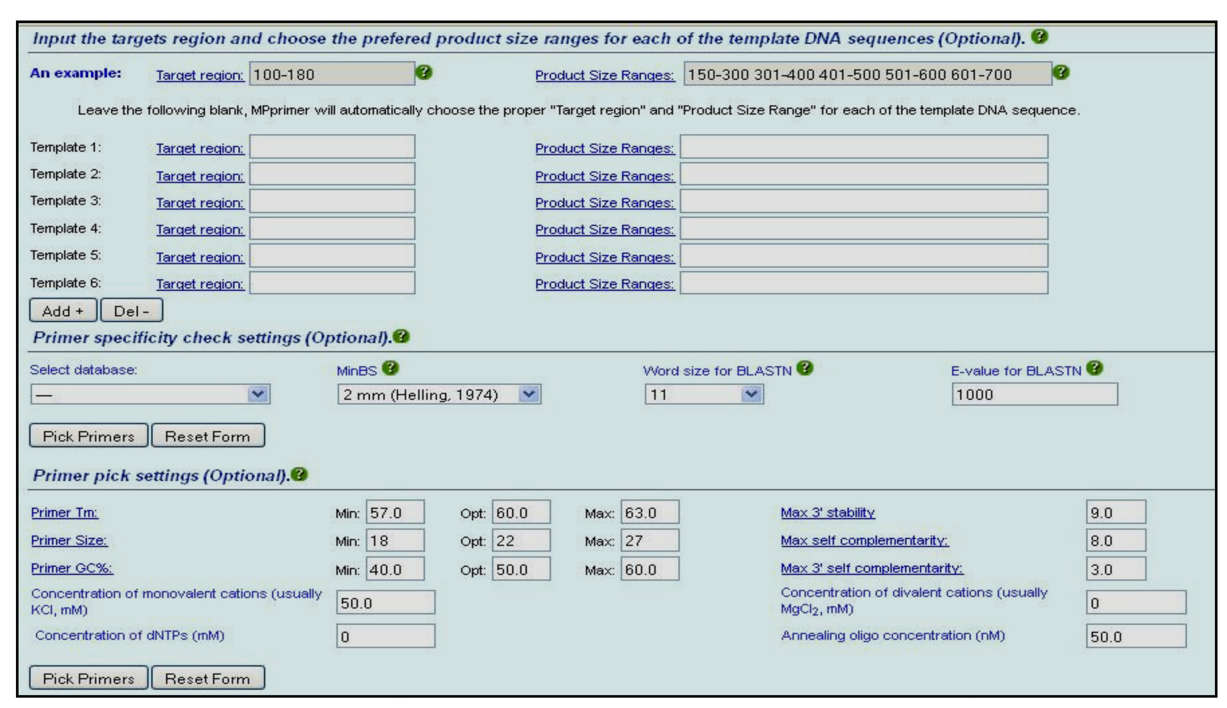
وكما موضح من واجهة البرنامج انه يمكن استعماله في إيجاد البوادىء للحالات القياسية وكذلك إيجاد بوادىء خاصة بعملية المثيلة (Bisulphite PCR) وأخرى للكوثرة الآنية (RT-PCR) وأخرى لتحديد التواليات (Sequencing) .

وهناك برامج أخرى تعمل في المضمار نفسه وتستعمل في دراسات خاصة مثل PRIDE و DOPRIMER وهي تهتم بتوضيح التشريح الداخلي للبوادىء وإظهار حالات التكامل .

- برامج **MP primer**

برنامج يصمم البوادىء لأكثر من هدف Multiplex وواجهته موضحة في الشكل التالي (51) ويظهر البرنامج النتائج بشكل مفصل بإسهاب مع كل البيانات الممكنة (ولا يوجد مجال في هذا الكتاب لإعطاء مثال مفصل) .





شكـل 51 : واجـهـة وإمـكـانيات الـبرنامـج MP primer

- **موقع PrimerStation**

موقع لتصميم بواديء لأهداف في الجينوم البشري لعمليات كوثرة متعددة Multiplex primers والتي يصل عددها الى 40 هدف في المرة الواحدة . ويقبل البرنامج RefSeq IDs للأهداف . وهناك خيارات عدة تساعد في زيادة دقة البواديء المصممة ، ويقوم الموقع بإجراء الإحصائيات واعتماد النواحي التجريبية للحصول على بواديء بتخصص عالي للمواقع في الجينوم البشري ، والخيارات المتاحة موجودة لاستبعاد الكثير من الحالات لزيادة التخصص والدقة والشكل التالي يوضح واجهة البرنامج (شكل 52)

PrimerStation multiplex PCR primer design site.

PCR targets

Enter RefSeq gene identifier and/or chromosomal range for genomic PCR target.
(The number of target sequences are limited up to 40.)

NM_014927
NM_145813
NM_014380
NM_012286
NM_144657
NM_000084
NM_022076
NM_152631
NM_004979
NM_016521

RefSeq IDs
الارقام التعريفية

Submit reset [help]

Design options [help]

Product size: from 60 bp to 600 bp

Minimum product size difference: 10 bp

Cation concentration: 1000 mM

Primer concentration: 0.2 uM

Avoid designing primers with known SNPs

Avoid undesirable secondary structures (slow) threshold dG= -2

Avoid PCR products with (A)n repeats n= 9

Avoid PCR products with (CA)n repeats n= 6

خيارات لزيادة الدقة

شكل 52 : واجهة PrimerStation

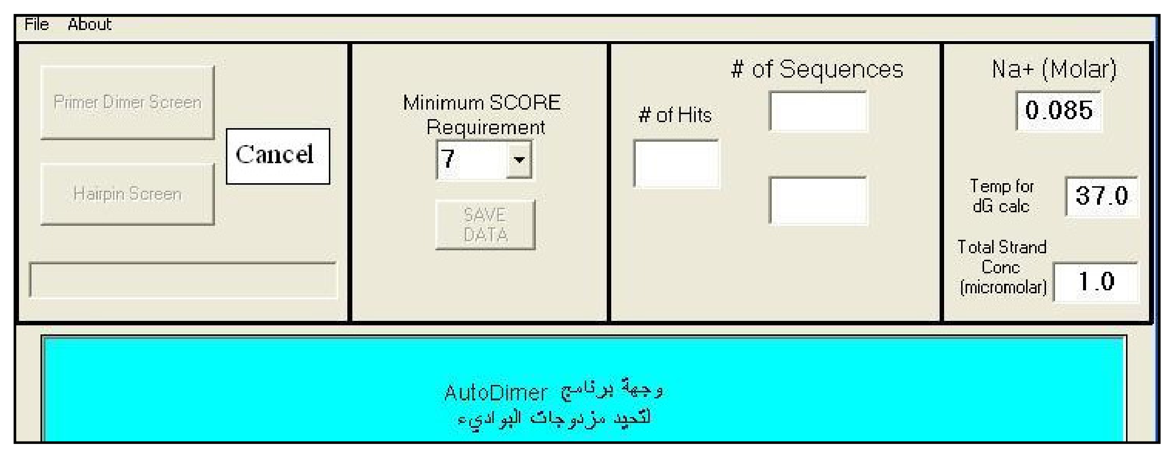
البرامج الخاصة

هنالك العديد من البرامج التي تختص بصفة واحدة للتأكد منها او تتخصص بتصميم بوادئ خاصة ومنها :

- **برنامج Autodimer**

برنامج يقوم بتحديد إمكانية تكون مزدوجات البواديء وإظهار البيانات الخاصة بهذه التراكيب الثانوية كما في الشكل 53 .

(http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/AutoDimerHomepage/AutoDimerProgramHomepage.htm) .



شكل 53 : واجهة البرنامج الخاص بإيجاد المزدوجات برنامج Autodimer

- **برنامج MethPrimer**

احد البرامج الخاصة يقوم بتصميم البواديء الخاصة بتفاعلات الكوثرة التي ترافقها عمليات المثيلة التي تمثل آلية مهمة من النواحي اللاجينية Epigenetics تشارك في تنظيم فعالية الجينات . وهناك طريقتان لدراسة هذه الحالة وهي : الطرق المعتمدة على المثيلة بـــ Bisulfite (Bisulfite- conversion –based PCR methods) (BSP) ، والأخرى التي تعنى بالمثيلة المتخصصة Methylation specific PCR (MSP) . يعتمد البرنامج أساسا على Primer3 ، ويعد من البرامج المفيدة في المساعدة في تحديد خارطة المثيلة . البرامج يقبل تواليات DNA ويقوم بالبحث عن جزر CpG ويصمم التواليات للمناطق التي تحيط من الجهتين او للمناطق التي يحددها المستخدم ، ويمكن ان يصمم بواديء للطريقتين المذكورة آنفا (BSP , MSP) . واجهة البرنامج والخيارات موضحة في الشكل الآتي (شكل 54)

Paste an ORIGINAL source sequence. Try this Sample sequence
You don't need to modify your sequence (e.g. convert 'C' to 'T') before pasting.

لصق التواليات دون الحاجة الى تحويرات مثل تحويل C الى T قبل اللصق

Pick primers for bisulfite sequencing PCR or restiction PCR.

Pick MSP primers.

Use CpG island prediction for primer selection?	Window	Shift	Obs/Exp	GC%
	100	1	0.6	50

Submit Reset

General Parameters for Primer Selection	
Sequence name (optional):	
Target (optional):	"start, size", such as (560, 30)
Excluded Regions (optional):	"start, size", such as (160, 50 1100, 50)
Number of output pairs (optional):	5

Product Size:	Min: 100	Opt: 200	Max: 300
Primer Tm:	Min: 50	Opt: 55	Max: 60
Primer Size:	Min: 20	Opt: 25	Max: 30
Product CpGs:	4	Primer Poly X:	5
Primer non-CpG 'C's:	4	Primer Poly T:	8

Parameters for MSP primers	
3'CpG constraint:	3
CpG in primer:	1
Max Tm difference:	5

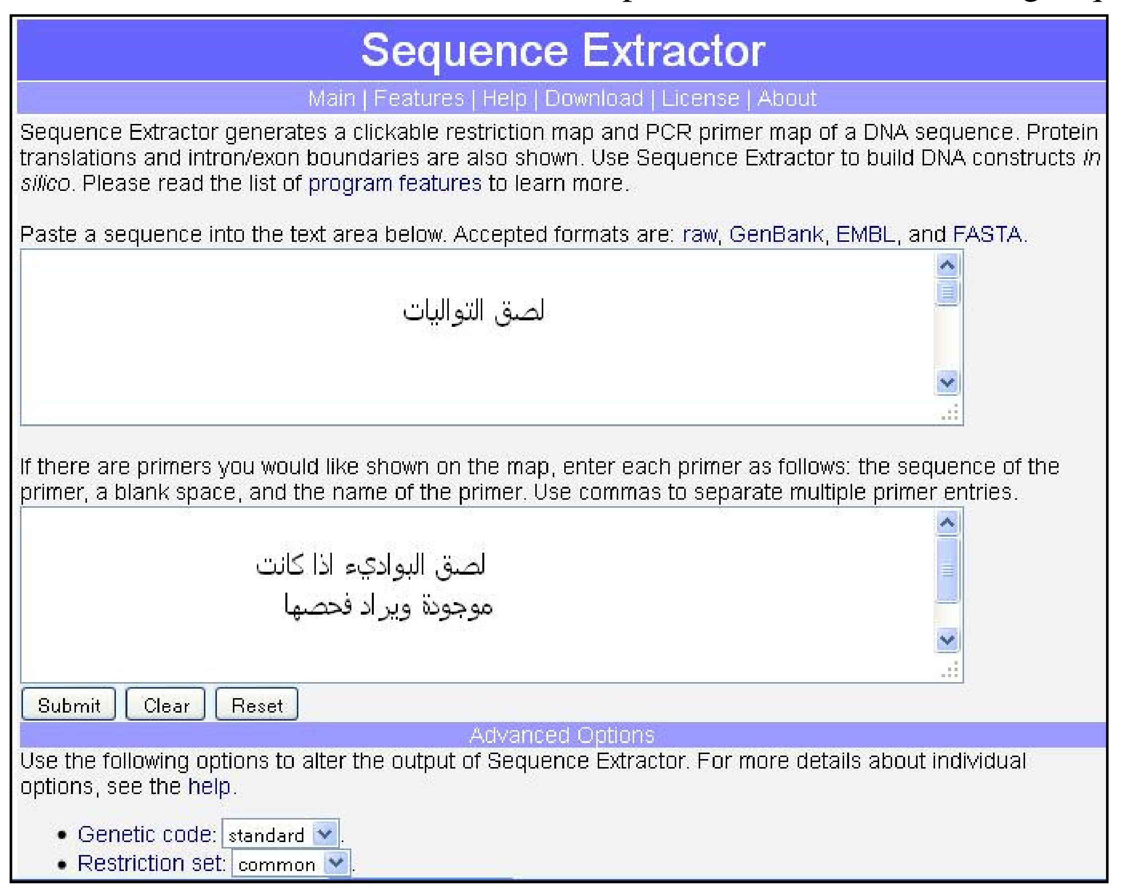
Submit Reset

شكل 54 : واجهة برنامج MethPrimer

برنامج **Sequence extractor**

البرنامج يفيد لأغراض أخرى غير تصميم البوادىء ، ويساعد في الحصول على خارطة التقطيع Restriction map وكذلك خارطة للبادىء وموقعه بالنسبة لتوالي DNA ، ويوفر البرنامج إمكانية التحكم بالمخرجات من وجود الاختيارات ، وواجهة البرنامج موضحة في الآتي : .

. (/http://www.bioinformatics.org/seqext)



شكل 55 : واجهة البرنامج Sequence extractor

- **برنامج Web primer**

موقع يحوي برنامج يستعمل لايجاد البواديء الخاصة لتفاعلات الكوثرة التي تستعمل نواتجها في تحديد التواليات

Web Primer

Sequences of primer sets available to the community

DNA Source [info]

Locus: Enter a standard gene name or systematic ORF name (i.e. ACT1, YKR054C)

ادخال اسم الجين او اي تعريف آخر

OR

Enter the DNA Sequence (numbers are OK, but comments should be removed)

ادخال التواليات ولكن بدون تعليقات

Purpose: PCR or Sequencing [info]

PCR [info] or

SEQUENCING [info]

Submit Reset

شكل 56 : واجهة الموقع Web primer

- **برنامج PrimerZ**

برنامج يستعمل لتصميم البوادىء لأغراض خاصة منها إيجاد البوادىء للــ

- المهدات Promoter .
- الاكسونات Exons .
- SNPs البشرية .

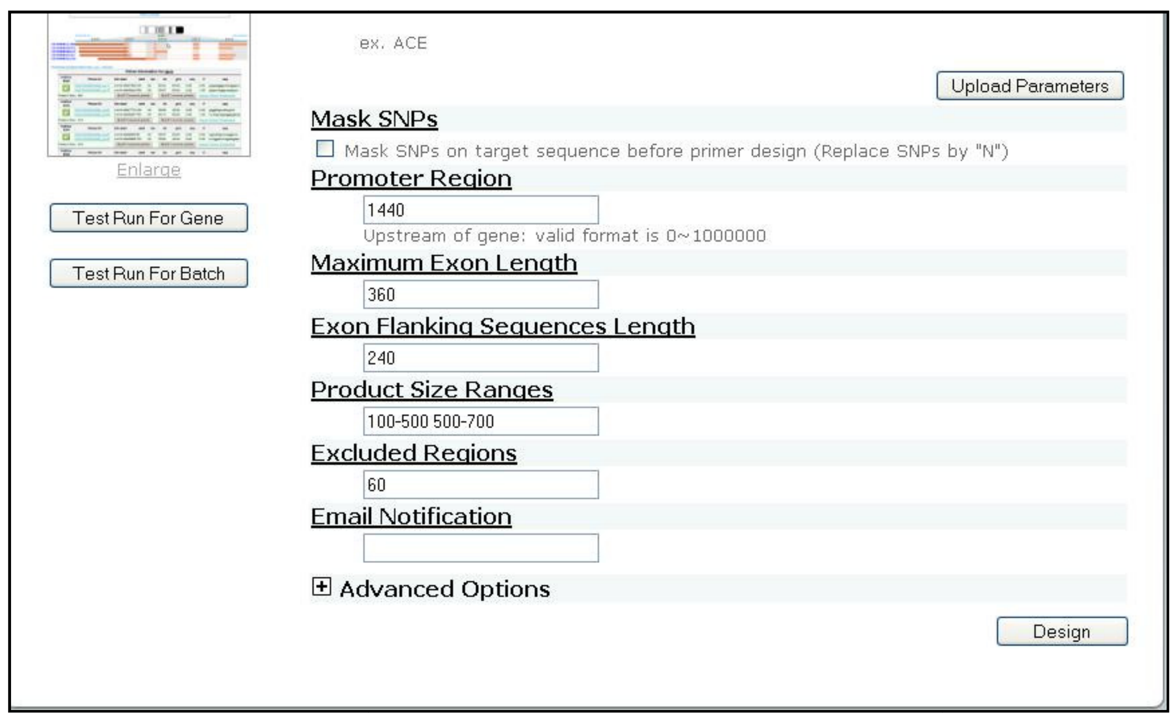
يعتمد على التسميات والأرقام التسجيلية في Ensemble database وكذلك SNPs database . ويمكن للبرنامج تقبل اسم الجين وكذلك تعريف SNPs (SNP rs ID) . وفيه الكثير من الخيارات ، ويمكن إعطاء النتائج بأكثر من صيغة لاستعمالها في تطبيقات أخرى .

في حالة التعامل مع المهدات يستعمل 1440 قاعدة قبل 5' UTR ويعاملها على أساس انها مهد ويجري عليها الحسابات اللازمة . والبرنامج يهمل التواليات ذات النوعيات الرديئة والأخرى الحاوية على العناصر المتكررة Repetitive elements مثل Alu sequences و LINE وغيرها. ومخرجات البرنامج تكون ملائمة وتزود بالمعلومات مثل موقع البادىء على الكروموسوم وروابط الى موقع NCBI وبرامجه مثل BLAST .

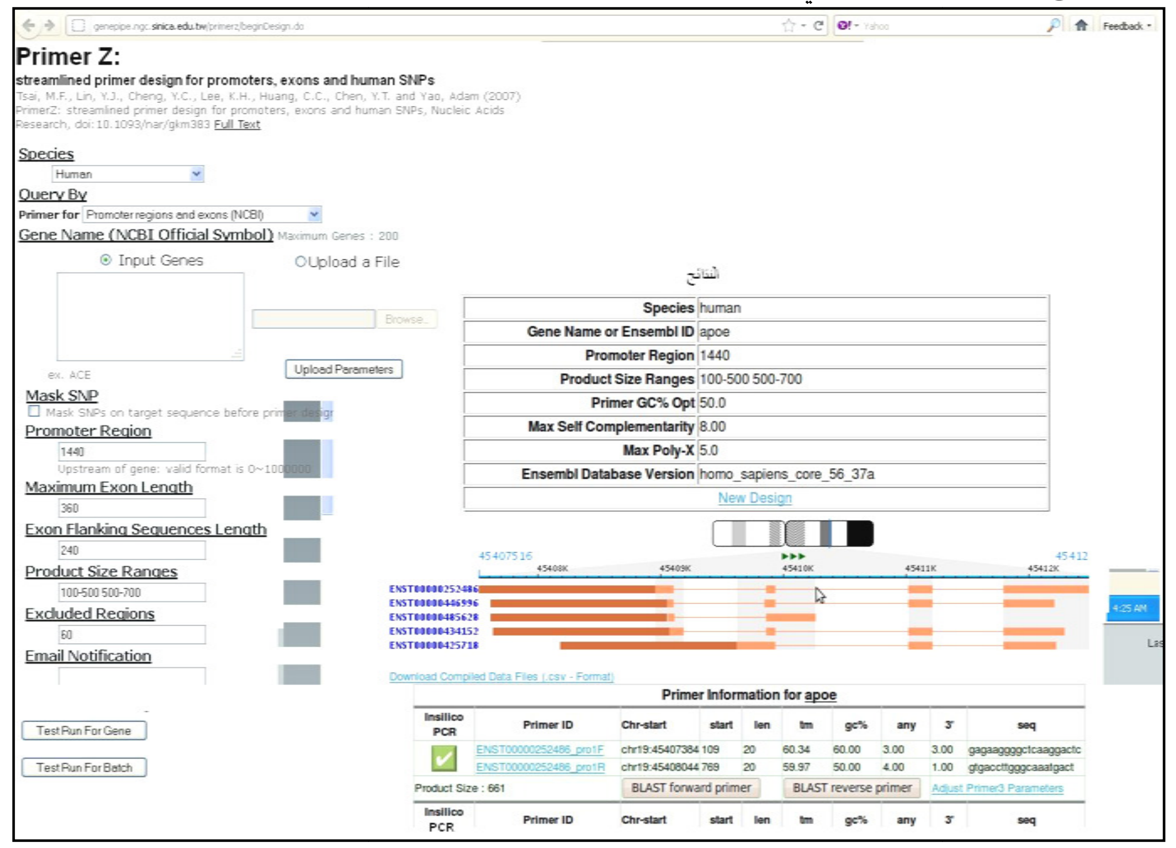
فضلا عن التزويد بالمؤشرات التقليدية مثل موقع البدء وطول البادىء وحرارة الانصهار والمحتوى من GC٪ والقواعد النتروجينية الموجودة في البادىء الذي أنتجه سواء الأمامي او العكسي ، ويحوي فقرة In Silico PCR لغرض تحديد التخصصية وحدس النواتج وروابط الى Ensembl لإعطاء تقرير عن القالب مثل الاكسونات وبعض تفاصيل البرنامج موضحة في الشكل 57 .



وتلحق بالواجهة الموضحة تكملة للاختيارات كما موضح في الآتي :



اما النتائج فموضحة كالآتي :



شكل 57 : واجهة وإمكانيات البرنامج PrimerZ

- **برنامج Codehop**

البرنامج الأصلي قد استبدل بالنسخة الحديثة iCodehop يختص البرنامج بتصميم البوادىء لتواليات في الأحياء الراقية . ويستعمل البرنامج ملفات غير مباشرة لتواليات البروتينات ذات العلاقة . والتواليات يجب ان تمر على برامج لجعلها بشكل قطاعات أي صيغها تكون Blocks database format باستعمال مخرجات بعض البرامج الخاصة مثل Block maker . كما يمكن استعمال نواتج الاصطفافات سواء بصيغة Clustal او FASTA بعد تحويلها الى قطاعات ، ثم تستعمل مخرجات البرامج كمدخلات في البرنامج كما في الشكل الآتي (شكل 58) :



شكل 58 : واجهة وخيارات برنامج Codehop

• برنامج **Pythia**

احد البرامج الخاصة بالنواحي الفيزياوية ولكنه يستعمل في تحديد صلاحية البوادىء ايضا عند تصميمها ويعتمد على الحركيات الحرارية Thermodynamics في حين ان البرامج الأخرى مثل Primer3 يعتمد على دالة تسجيل الدرجات Scoring function . وتكون قياسات الطاقة معتمدة على البرمجة الداينميكية Programming dynamics لتحديد عمليات الارتباط والطوي وتكون من مفرداتها :

◊ قياس طاقة ازدواج القواعد .

◊ قياس طاقة تراص القواعد Staking energy .

◊ الطاقة اللازمة لتكوين ماشات الشعر والعروات الداخلية والعقد الكاذبة Pseudo-nodes .

ومقارنة ذلك بالثبوت الحراري الحركي لجزيئات مزدوجات DNA ولكل من هذه المفردات خوارزميات Algorithms لحسابها .

وكل هذه الطاقات اللازمة للارتباط والطوي لعدد من الكيمياويات المتنوعة (القواعد النتروجينية) التي تدمج حساباتها في قياس الكفاءة تدخل في حسابات جودة أداء البرامج النهائية لتفاعلات الكوثرة .

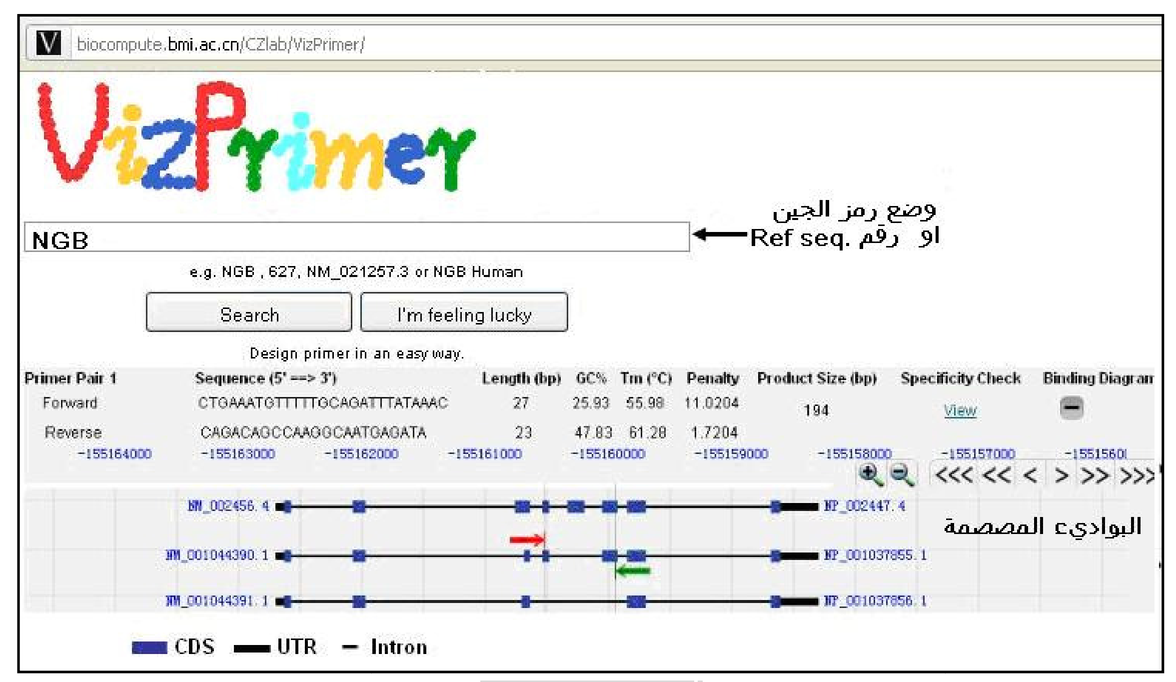
- **برنامج VizPrimer**

احد البرامج الخاصة بإيجاد البوادىء لجينات خلايا حقيقية النواة والواجهة موضحة في الشكل 47 الخاصة بتصميم بوادئ للجين NGB .

ويلاحظ ان مدخلات البرنامج هي أسماء الجينات وليس تواليات ليقوم البرنامج باختيار البوادىء الملائمة ويظهر البيانات الخاصة بها . ويحوي البرنامج ضمن قواعد بياناته على عدد من الأحياء المهمة من أحياء متنوعة مثل :

- *Homo sapiens* (Human) TaxId:9606
- *Mus musculus* (House Mouse) TaxId: 10090
- *Rattus norvegicus* (Norway rat) TaxId: 10116
- *Danio rerio* (Zebrafish) TaxId: 7955
- *Arabidopsis thaliana* (Thale Cress) TaxId: 3702
- *Caenorhabditis elegans* (Nematodes) TaxId:6239
- Drosophila *melanogaster* (*Fruitfly*) *TaxId*: *7227*
- *Gallus gallus* (Chicken) TaxId: 9031
- *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's yeast) TaxId: 9031

ولكن يؤمل ان تزداد الأحياء في قواعد بيانات البرنامج . ويكون لتركيب الجين دورا مهما في تصميم البوادىء خاصة في جينات حقيقيات النواة التي فيها تغايرات كبيرة في مواقع الفلق التي يحتاج المستخدم لإيجادها عن طريق PCR . ويكون البرنامج ملائما لتضخيم أطُر القراءة المفتوحة ORFs وكذلك الكشف عن SNPs . ويصمم البرنامج أكثر من زوج من البوادىء يمكن إظهارها في تقرير البرنامج VizPrimer report الموضحة في الجدول الملحق بالشكل (59) (http://biocompute.bmi.ac.cn/CZlab/VizPrimer/) .



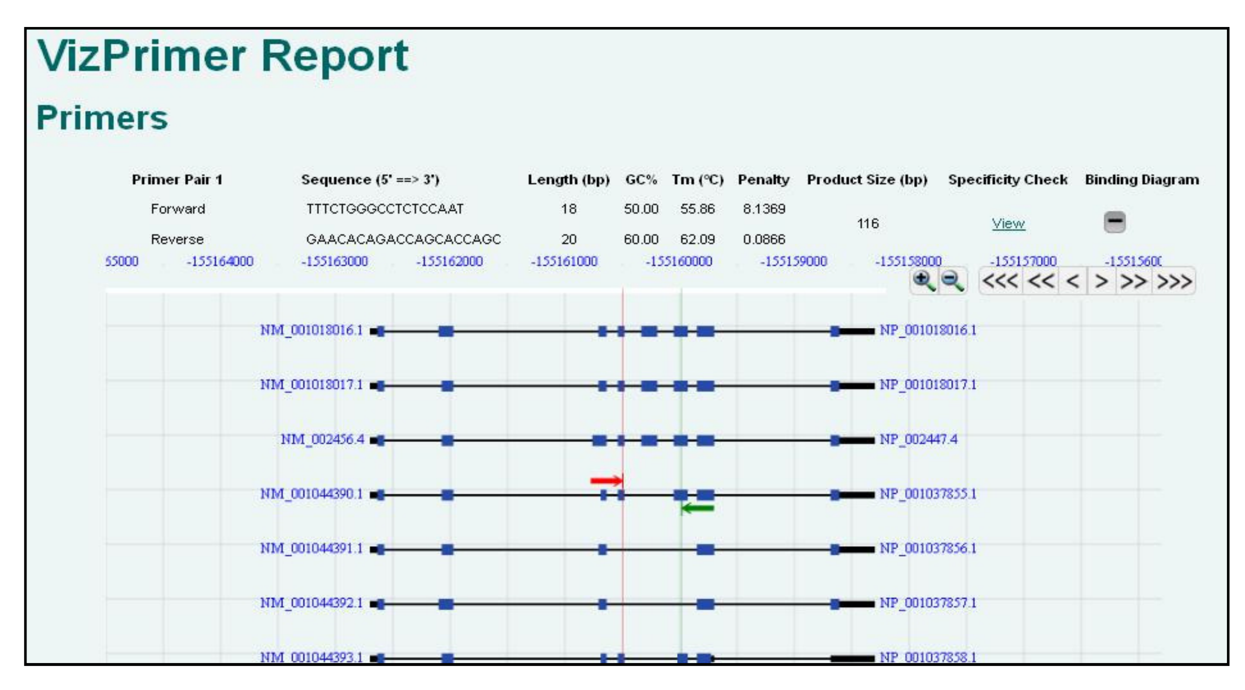
VizPrimer Report

Primers

Primer Pair 1	Sequence (5' ==> 3')	Length (bp)	%GC	Tm (°C)	Penalty	Product Size (bp)	Specificity Check	Binding Diagram
Forward	TTTCTGGGCCTCTCCAAT	18	50.00	55.86	8.1369	116	View	−
Reverse	GAACACAGACCAGCACCAGC	20	60.00	62.09	0.0866			
Primer Pair 2	Sequence (5' ==> 3')	Length (bp)	%GC	Tm (°C)	Penalty	Product Size (bp)	Specificity Check	Binding Diagram
Forward	TTTCTGGGCCTCTCCAAT	18	50.00	55.86	8.1369	138	View	+
Reverse	TAGACAATGGCCAGCGCAAC	20	55.00	61.88	0.1164			

شكل 59 : برنامج VizPrimer ومخرجاته

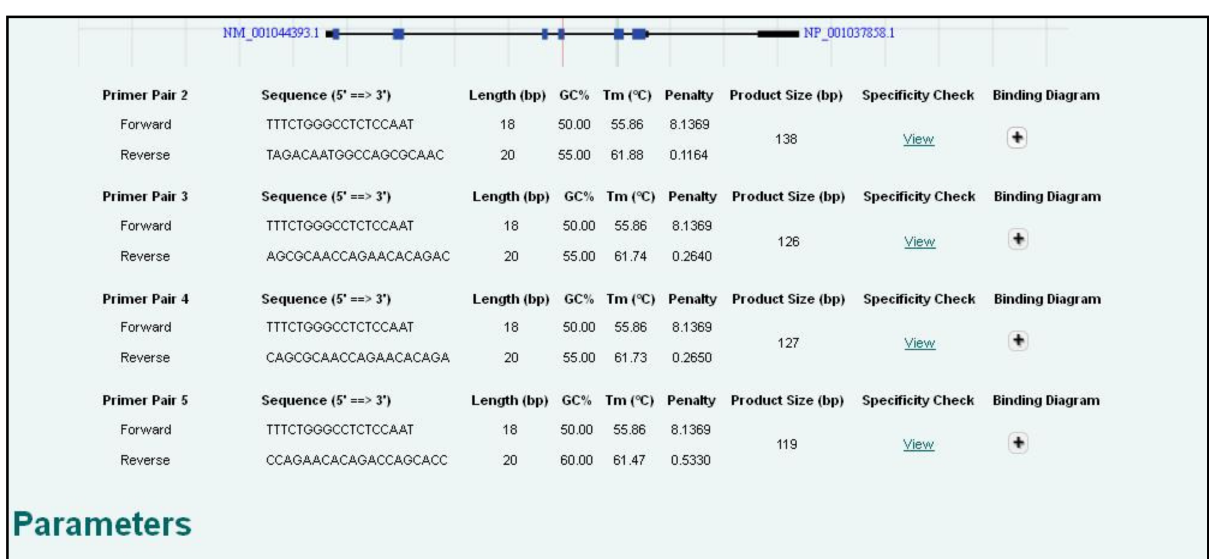
عند النقر على الإشارة (+) تظهر التفاصيل الخاصة لكل بادىء كما موضح في الشكل الآتي (60) :



VizPrimer Report

Primers

Primer Pair 1	Sequence (5' ==> 3')	Length (bp)	GC%	Tm (°C)	Penalty	Product Size (bp)	Specificity Check	Binding Diagram
Forward	TTTCTGGGCCTCTCCAAT	18	50.00	55.86	8.1369	116	View	
Reverse	GAACACAGACCAGCACCAGC	20	60.00	62.09	0.0866			



Primer Pair 2	Sequence (5' ==> 3')	Length (bp)	GC%	Tm (°C)	Penalty	Product Size (bp)	Specificity Check	Binding Diagram
Forward	TTTCTGGGCCTCTCCAAT	18	50.00	55.86	8.1369	138	View	
Reverse	TAGACAATGGCCAGCGCAAC	20	55.00	61.88	0.1164			

Primer Pair 3	Sequence (5' ==> 3')	Length (bp)	GC%	Tm (°C)	Penalty	Product Size (bp)	Specificity Check	Binding Diagram
Forward	TTTCTGGGCCTCTCCAAT	18	50.00	55.86	8.1369	126	View	
Reverse	AGCGCAACCAGAACACAGAC	20	55.00	61.74	0.2640			

Primer Pair 4	Sequence (5' ==> 3')	Length (bp)	GC%	Tm (°C)	Penalty	Product Size (bp)	Specificity Check	Binding Diagram
Forward	TTTCTGGGCCTCTCCAAT	18	50.00	55.86	8.1369	127	View	
Reverse	CAGCGCAACCAGAACACAGA	20	55.00	61.73	0.2650			

Primer Pair 5	Sequence (5' ==> 3')	Length (bp)	GC%	Tm (°C)	Penalty	Product Size (bp)	Specificity Check	Binding Diagram
Forward	TTTCTGGGCCTCTCCAAT	18	50.00	55.86	8.1369	119	View	
Reverse	CCAGAACACAGACCAGCACC	20	60.00	61.47	0.5330			

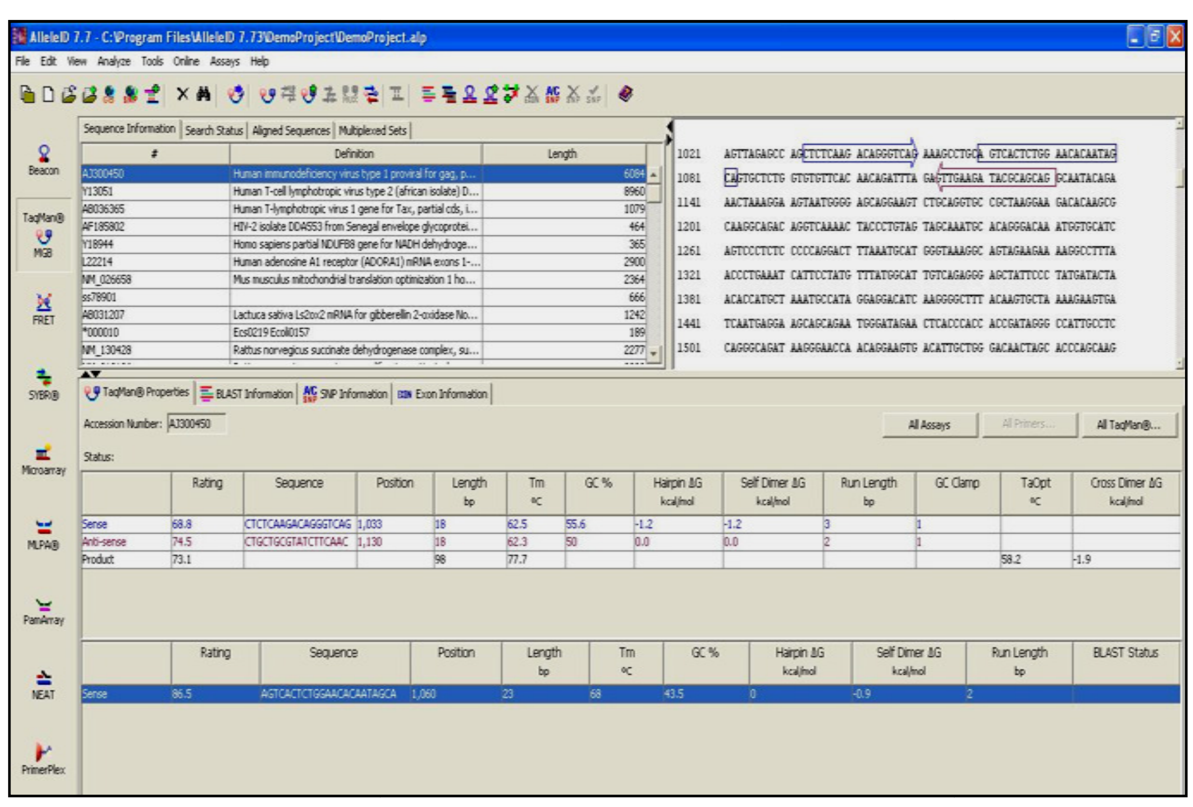
Parameters

شكل 60 : الامكانيات الاضافية في برنامج VizPrimer

اما عند النقر على مفردة (View) فتظهر الإحصائيات الخاصة واللغة التي كتب بها البرنامج .

• برنامج **AlleIID**

احد البرامج الخاصة التابعة لشركة Primer Biosoft يقوم بتصميم البوادىء لعملية التميز بين السلالات البكتيرية والفيروسات (وبوادىء أخرى) ، وكذلك العمليات المستعملة في تشخيص المرضات . يعمل البرنامج اصطفاف لتواليات DNA وإيجاد المناطق الثابتة ثم يصمم البوادىء الخاصة بتضخيمها من بين خليط التواليات المختلفة . ويقوم البرنامج بتصميم بوادىء خاصة بطريقة qPCR وكذلك بوادىء للمصفوفات الدقيقة Microarrays وأخرى لعمليات التهجين والشكل (61) يوضح واجهة البرنامج مع إعطاء المعلومات التقليدية لوصف البوادىء المستعملة .



شكل 61 : واجهة ومخرجات برنامج AlleIID

ويستعمل البرنامج لتصميم المجسات من النيوكليوتيدات لإجراء التحليلات او التقديرات النوعية والكمية الصعبة مثل تلك التي تستعمل في تفاعلات الكوثرة المتعددة Multiplex PCR وكذلك يستعمل في تحضير بوادىء من نوع Cross species primers .

• برنامج PathoGene

يستعمل البرنامج لايجاد المناطق المشفرة CDS ولذلك البواديء المصمم لكل جينومات الاحياء المجهرية الموجودة في قاعدة بيانات البرنامج (PathoGene Database) ، ويمكن استعمال البرنامج باكثر من حالة مثل اختيار ملفات GenBank او ملفات القاعدة TIGR .

وواجهة البرنامج تتقبل التواليات بصيغة FASTA والتي يمكن ان تكون بشفرات IUPAC وتوفر الواجهة مؤشرات كثيرة للاختيار . كما ان البرنامج يمكن من فصل CDS الى قطع اكبر من 500 قاعدة وفق اختيار المستخدم ، وكذلك ايجاد مناطق الى يسار المهد وتصميم البواديء لها ، ويمكن من ايجاد التواليات المجنحة للمناطق المشفرة CDS فضلا عن امكانيات اخرى مثل اجراء عمليات الاصطفاف BLASTing كما موضح في الشكل الاتي (شكل 62)

PathoGene ™

A CDS Finding and Primer Design Tool for Microorganisms

Choose organism:

- ◉ Bacteria: Saccharophagus degradans 2-40
- ○ Virus: ---------------------- Select Virus ----------------------
- ○ Fungi: ---------------------- Select Fungi ----------------------
- ○ NIH Categorized Agents: ---------------------- Select NIH Agent ----------------------
- ○ CDC Categorized Agents: ---------------------- Select CDC Agent ----------------------

Choose locating method:

- ◉ GenBank Annotation
- ○ TIGR Glimmer v2.13 — Glimmer options:

Find CDS by:

- ◉ Number — CDS:
- ○ Gene Name (Annotation only)
- ○ Locus Tag (Annotation only)

OR

Enter a FASTA format sequence:

> [optional comments] [carriage return or enter]
[DNA sequence with A, C, G, T, M, N, and/or W]

الرموز المستعملة من قبل IUPAC

These symbols should **NOT** be used in the comments field: ` # $ % & ( ) \ | ; ' " < > / ?

or upload a FASTA format file (PLAIN-TEXT only): Browse...

SUBMIT RESET

Primer Picking Parameters

No.to Return:	5		Max 3' Stability:	9.0	
Max Mispriming:	12.00		Pair Max Mispriming:	24.00	
Product Size	Min: 200	Opt: 800	Max: 1000		
Primer Size	Min: 18	Opt: 23	Max: 27		
Primer Tm	Min: 57.0	Opt: 60.0	Max: 63.0		
Primer GC%	Min: 45.0	Opt: 50.0	Max: 55.0		
Max Self Complementarity:	8.00		Max 3' Self Complementarity:	3.00	
Max #N's:	0		Max Poly-X:	3	
CG Clamp:	0		Max Tm Difference:	1.0	

○ Generate Internal Primers ○ Generate RT-PCR primers

Sequence Options

- ☑ Split CDS > 500 bp
- ☐ Find upstream "promoter" region and design primers
- ☐ Find 2 kbp upstream region and design primers

Flanking sequence for CDS: 200 nucleotides

Buffer sequence between primer and CDS: 50 nucleotides

خيارات اخرى

BLAST Options

- ☐ BLAST PCR product against selected genome
- ☐ BLAST primers against selected genome
- ☐ Send reply to the email address

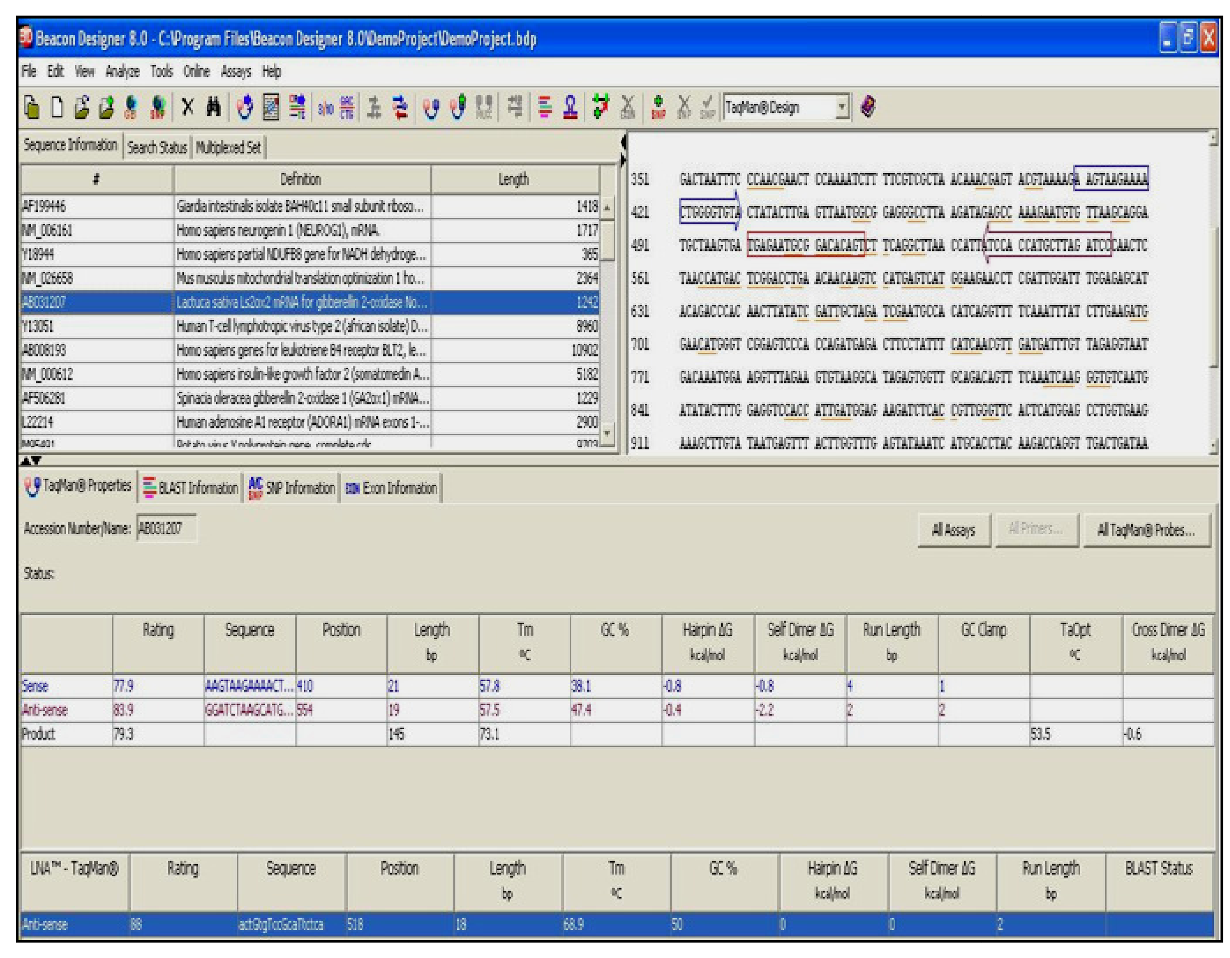
SUBMIT RESET

شكل 62 : برنامج PathoGene

برنامج Beacon designer

احد البرامج الخاصة التابعة لشركة Primer Biosoft . ويعمل بشكل رئيس في مجال تفاعلات الكوثرة الكمية qPCR . ويمتاز البرنامج بإمكانياته في تصميم بوادىء خاصة بطريقة RT-PCR التي تكون بعيدة عن تكوين التراكيب الثانوية بارتباطه بمجهز خدمة mFold server . كما يستعمل البرنامج في تقييم البوادىء المصممة مسبقا ، و كذلك يستعمل في تصميم الجسات . ويستعمل البرنامج في إيجاد البوادىء للأنواع المختلفة Cross species والبوادىء الخاصة بالنوع .

ونتائج البرنامج توضح مزدوجات البوادىء الذاتية او مع البوادىء الأخرى بشكل مصور . ويستعمل في تصميم البوادىء للعديد من الأغراض مثل تفاعل الكوثرة المتعدد Multiplex PCR و RT-PCR باستعمال SYBR Green I و TaqMan وكذلك مجسات لتقدير LNA assays . والشكل التالي (شكل 63) يوضح واجهة احد إصدارات البرنامج .

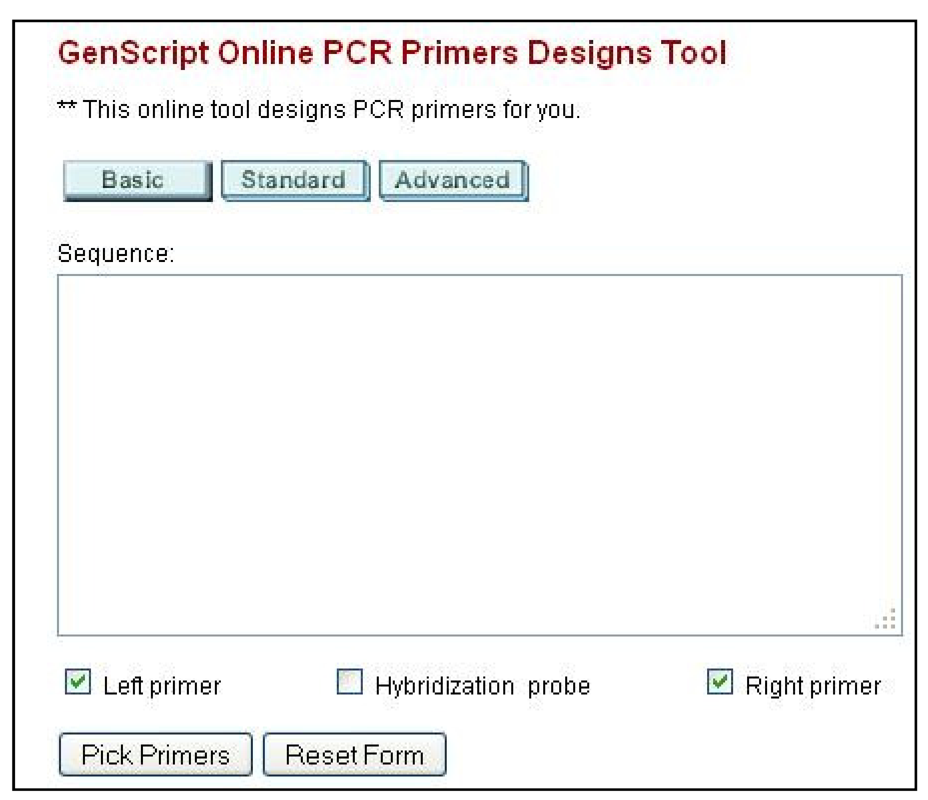


شكل 63 : واجهة ومعطيات برنامج Beacon designer

واستعماله في تحديد صلاحية البوادىء يعتمد أساسا على استعمال برنامج BLAST لصف التواليات واستعمالها في تصميم البوادىء مما يؤدي الى ان الأخيرة تكون ذات تخصص جيد . ويستعمل كذلك لتصميم بوادىء Multiplex (ربما لحد 4 أنواع) والتي يتم التأكد منها من قبل البرنامج من مختلف النواحي .

حزمة برامج GenScript

تحوي الحزمة على أكثر من برنامج لتصميم البوادىء لأغراض مختلفة منها الأغراض العامة كما موضح في الشكل الآتي (شكل 64) :



شكل 64 : احد جوانب حزمة GenScript

ويحتاج البرنامج الى بعض الايضاحات مثل طول المسافة بين المناطق التي ترتبط اليها البوادىء والمراد تحديد تواليتاها واقيم الاصلية للبرنامج محددة بـ 40 قاعدة .
ويستعمل الاصدار الآخر او البرنامج الآخر من برامج الحزمة لايجاد بوادىء تفاعل الكوثرة الآني عند استعمال المجسات مثا PCR (TaqMan)Primer design فضلا عن تحديد المجسات . ويمكن في المرة الواحدة تمشية 20 من البوادىء . وعند استعمال البرنامج

لتحديد بواديء للاكسونات يجب تحديد الاكسونات بشكل دقيق والمناطق بين الاكسونات بوضع نقطتين بين الاكسونات كما موضح في الاتي :

'ACGCGCG:CGTACG'

اما اذا ادخل توالي غير معروف فان البرنامج يقوم بوضع خارطة لحدود الاكسونات على الجينومات المتوفر عليها وهي جينومات الانسان والفيران والجرذان الموجودة في قاعدة بيانات البرنامج . ويستعمل البرنامج Accession No. كمدخلات من GenBank والتي يجب ان تكون خالية من ارقام الاصدرات او التعديلات التي جرت على التوالي ويستعمل البرنامج الارقام التعريفية RefSeq التي يقوم بجلبها من موقع NCBI . والشكل التالي (شكل 65) يوضح امكانيات البرنامج والمدخلات التي يتقبلها وما يلحق بها من خيارات يمكن للمستخدم املائها على البرنامج .

GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design

** This online tool designs real-time PCR (TaqMan) primers for you.

Number of Primer/Probe Sets to Return (Limit 20 Sets) 3

PCR Amplicon Size Range 50-150

Primer Tm Minimum 58 Optimum 59 Maximum 60 °C

Probe Tm Minimum 68 Optimum 69 Maximum 70 °C

Organism: Human

☐ Pick Primer/Probe Crossing Exon Junction

Target Nucleotide Sequences:

- GenBank Accession:
- or Paste in the DNA Sequence in raw format:

```
 atgg aaatacaaca aacacaccgc aaaatcaatc gccctctggt
      841 ttctcttgct ttagtaggag cattggtcag
catcacaccg caacaaagtc atgccgcctt
      901 ttttacaacc gtgatcattc cagccattgt
tgggggcatc gctacaggca ccgctgtagg
      961 aacggtctca gggcttcttg gctgggggct
```

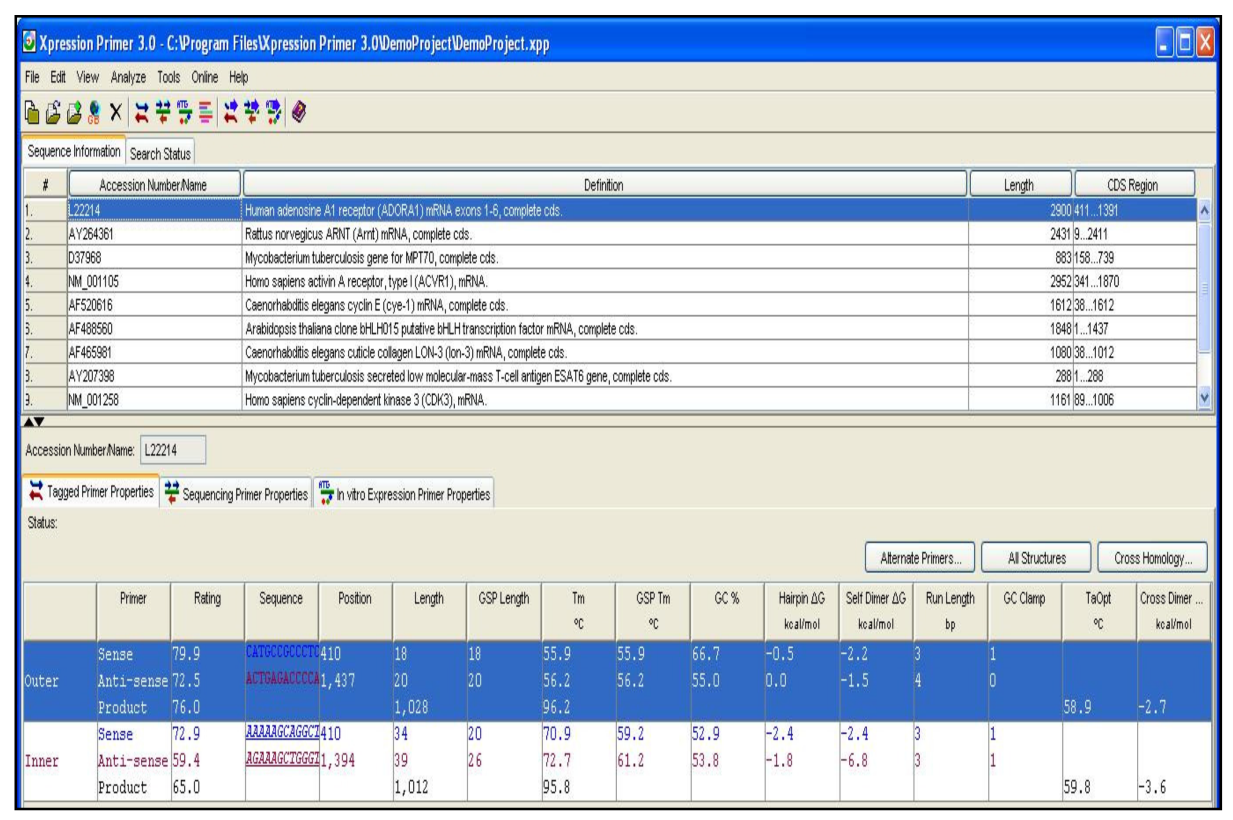
Start Reset

شـكـل 65 : احـد جـوانـب حـزمـة GenScript

- **برنامج Xpression primer**

يساعد في تصميم البواديء المستعملة في تجارب الكلونة ، والتأكيد في البرنامج على اطر القراءة المفتوحة Open reading frames (ORFs) الثابتة ، وذلك بتصميم البواديء للمناطق الخارجية من مناطق UTRs وأخرى للعنقدة الداخلية . ويكون اختيار المناطق الثابتة بعد ان يقوم البرنامج بإجراء عمليات الاصطفاف (BLASTing) .

ويستعمل البرنامج لتصميم بواديء لتحضير النماذج لعمليات تحديد التواليات ايضا لعدد من التواليات في عملية واحدة ، وبعض فعاليات البرنامج تصبح ممكنة نتيجة لارتباطه بقواعد بيانات ووسائل بحث عامة مثل Entrez . والشكل 66 يوضح واجهة البرنامج والبيانات التي يمكن ان يقدمها .



شكل 66 : واجهة ومعطيات برنامج Xpression primer

وفضلا عما ذكر من البرامج التي يمكن ان تكون منفردة الواجهة والاستعمال توجد مواقع تحوي على حزم من البرامج ومنها على سبيل المثال لا الحصر .

JCSG primer selection tools

هذه الحزمة تعنى بحالة التحمل لدرجات الانصهار التي تعطى بشكل محدد مع ± 2.5°م . وإدخال صفة التحمل تكون مفيدة جدا لانها تعطي مدى واسع من إيجاد البواديء الملائمة ، فمثلا اذا كانت درجة حرارة الصهر 62.5°م ، فان جعل المدى بين 60-65°م سوف يسمح لعدد كبير من البواديء الملائمة بالارتباط ضمن هذا المدى (5°م) . ولكن اذا أعطى البرنامج ضمن نافذة المدى قيمة صفر فانه سوف لا يعطي أي باديء لانه لا يوجد باديء ملائم جدا Fit exactly عند درجة محددة . فمثلا عند درجة 60°م وتحمل صفر فهذا يعني انه لا يوجد باديء يصمم او يعمل عند درجة حرارة 60.1 او 59.9°م .وهذه موضحة في الشكل الآتي :

JCSG Primer Selection Tool

Target List: Browse...

File Format: Gene Name <TAB> Start <TAB> End <NEWLINE>

Sequence FASTA file: Browse...

FASTA includes stop codons: ☐ وضع التوالي المستهدف او البحث عنه

Temperature: C (62.5) Tolerance: C (2.5)

Salt Concentration: mM (100)

$T_m = 81.5 + 16.6 \log [Na^+] + 41(G+C)/length - 500/length$

Min Sequence: bp (18) Max Sequence: bp (35)

Theoretical bp Range:

Forward Primer Restriction Site:

Reverse Primer Restriction Site: CCCGGCCGGCCCTA

Prepend ATG to segments: ☑ Convert xTG to ATG on full or truncated sequences: ☑

انواع الفايلات المرغوب الحصول عليها ◉ Excel ○ Tab Delimited ○ Operon Form Get Primers Reset

شكل 67 : واجهة JCSG primer selection tools التي تساعد في تحديد صفة التحمل الحراري

• Primer Design and Search Tool

من الوسائل العامة التي تقدم الخدمات في مجال تفاعلات الكوثرة الموضحة واجهتها في الشكل الاتي :

Primer Design and Search Tool

Menu
Primer tm
Primer score
Simple search
Primer search, ePCR
Primer design
MSP design
Parameters

Help
Manual
Faq
Manuscripts
ChangeLog
Genome builds
Comments

Statistics

Visitors:	100619
Primer tm:	27239
Primer score:	5636/3530
Search:	5810/3128
Fast PCR:	1616949/128906
Primer design:	21407/31341
MSP design:	8043
Version:	2.22
Last update:	17/03/10

Search for the best primer pairs

Sequence:
```
 atgg aaatacaaca aacacaccgc aaaatcaatc gccctctggt
      841 ttctcttgct ttagtaggag cattggtcag catcacaccg
caacaaagtc atgccgcctt
      901 ttttacaacc gtgatcattc cagccattgt tgggggcatc
gctacaggca ccgctgtagg
```

Bisulfite
Set search region for: Forward primer: - Reverse primer: -
Max length of PCR: 400

Search primers | Clear Input

Parameters

Primer melting temperature

Primer conc	1.0	mikromol	Glycerol conc	0.0	%
Potassium conc	50.0	milimol	Ethylen glycol conc	0.0	%
Magnesium conc	1.5	milimol	Formamid conc	0.0	%

Primer scoring values

Description	Weight	Min	Opt	Max	Description	Weight	Max
Primer length	0.5	20	23	35	Self annealing	0.1	20
GC content	1.0	40.0	50.0	60.0	Self end-annealing	0.2	10
GC content (bis)	1.0	0.0	30.0	60.0	Pair annealing	0.1	20
Melting temp	1.0	45.0	60.0	70.0	Pair end-annealing	0.2	10

Primer design

Results list size 10 | Max Tm diff 8.0 | Minimum of CpGs 1

Database search and fast PCR

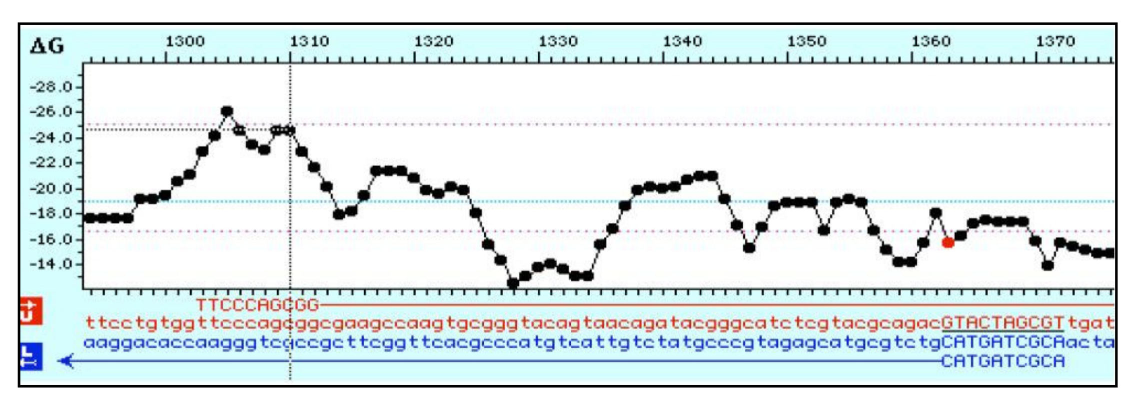
Database	--Select genome	Mismatches	0000000011111111 Max: 4
PCR length	1000	PCR product to show	100
		Primer matches to show	100

شكل 68 : واجهة خدمة تفاعلات الكوثرة Primer Design and Search Tool

وفيها تستعمل التواليات لايجاد البواديء العامة للمناطق المراد تضخيمها ، او تلك الخاصة بعمليات المثيلة بوجود امكانيات التغيير او الاختيارات الملائمة للمستخدم .

• **برنامج Oligo7**

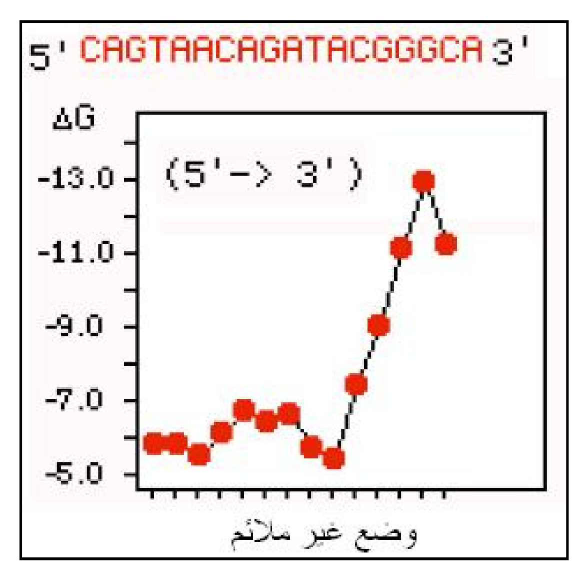
من البرامج المهمة جدا في مجال تصميم البواديء ، ويعتمد في حساباته على الطاقة الحرة سواء لتوالي البادىء او القالب ، والشكل التالي يوضح واجهة البرنامج لهذه الخاصية



شكل 69 : نمط الطاقة الحرة GΔ التي يظهرها برنامج Oligo7

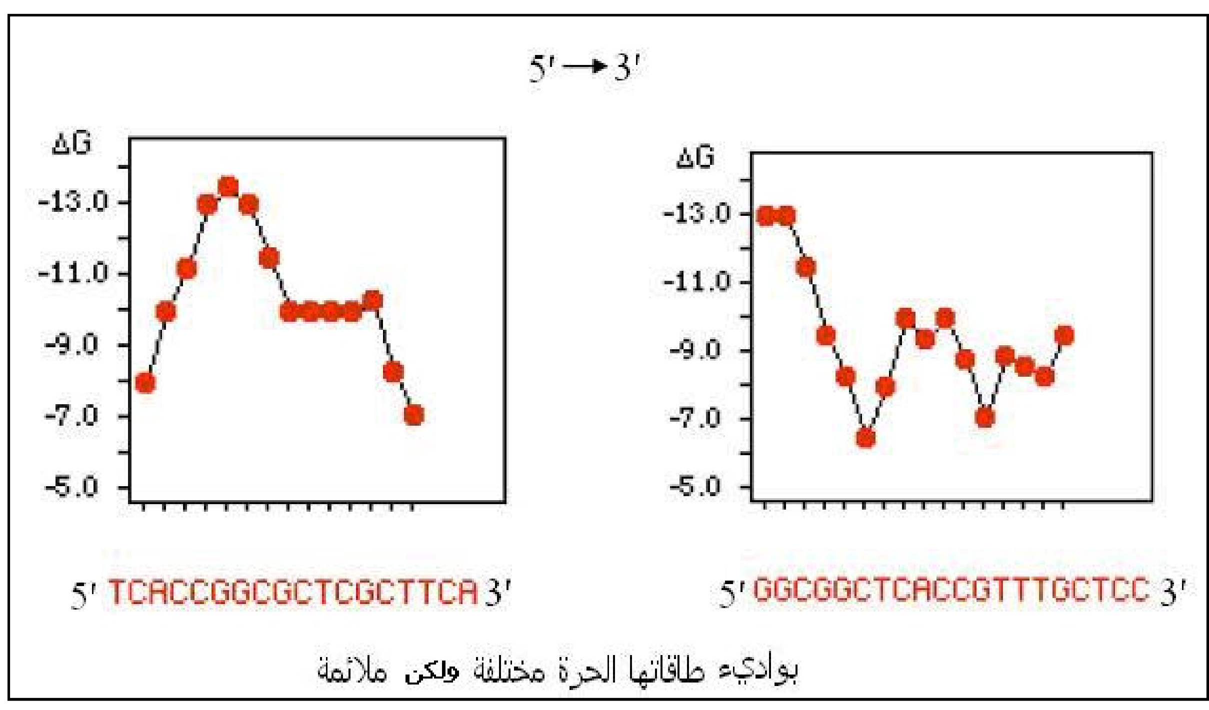
ويظهر البرنامج في حالة كون الطاقة الحرة للطرف '3 تكون غير ملائمة كما في الشكل التالي

وتكون الحالة غير المرغوب فيها هذه عندما يكون الطرف '3 للبادىء غنيا بـ GC كما موضح في الشكل الآتي(شكل 70) .



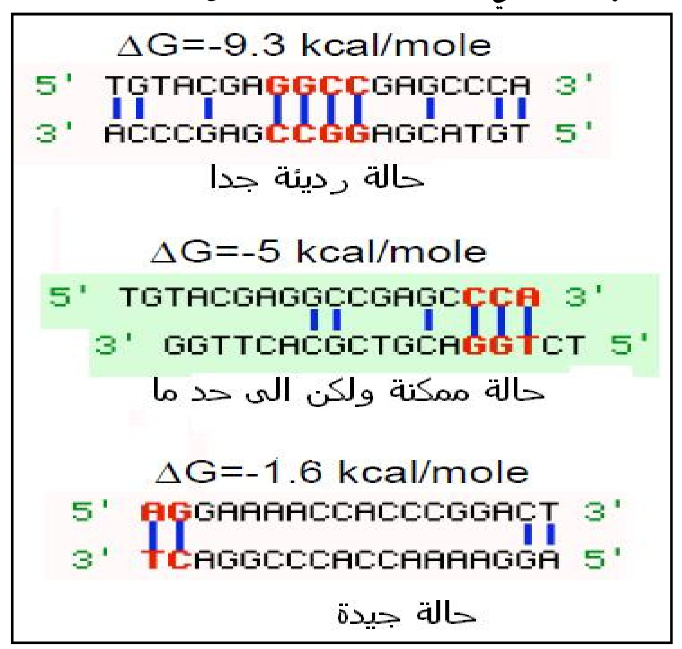
شكل 70 : الوضع غير الملائم من حيث الطاقة للطرف '3

ولكن عندما يكون البادىء فيه نسب ملائمة من GC يظهر مخطط الطاقة ملائما كما في الشكل الآتي (شكل 71)



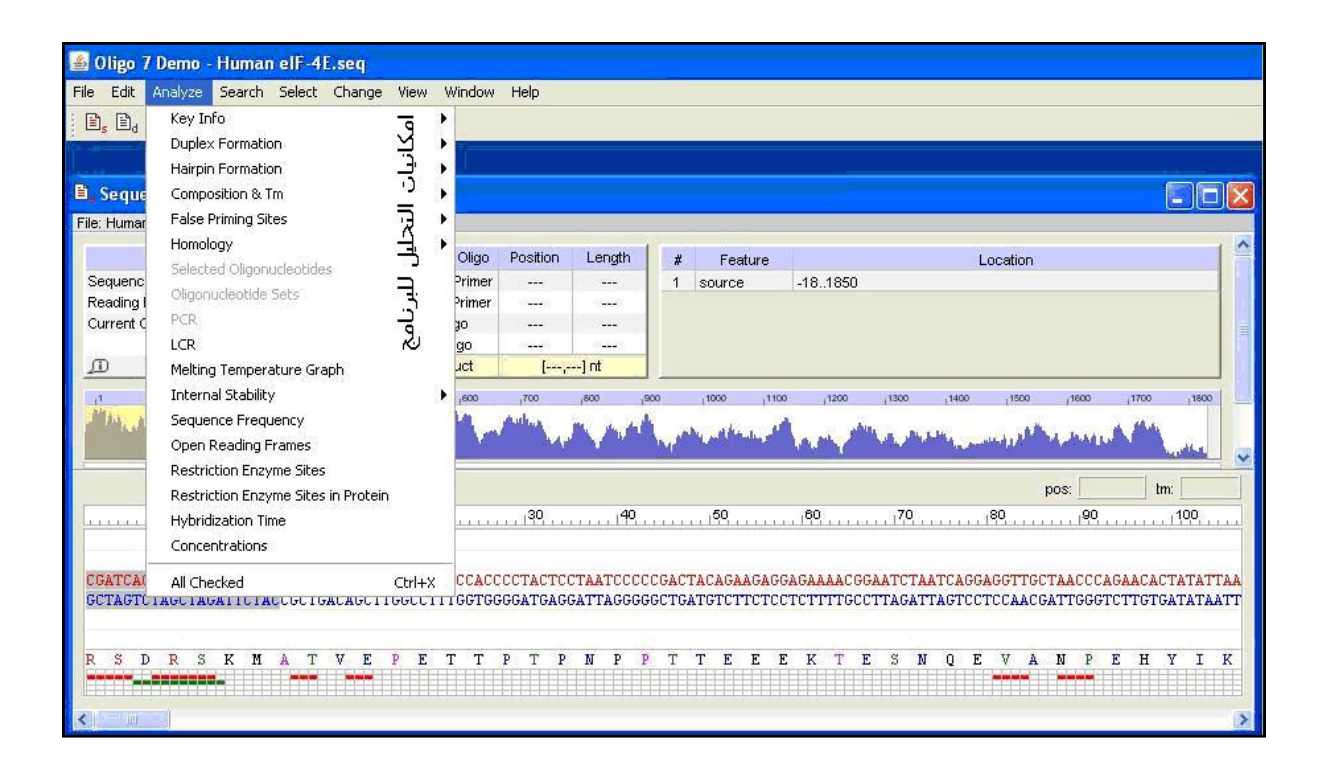
شكل 71 : ملائمة البوادىء من حيث الطاقة كما يظهرها برنامج Oligo7

ويوضح البرنامج حالات ازدواج البوادىء فضلا عن الإشارة الى انها تكون محتملة او لا اعتمادا على الطاقة الحرة كما في الحالات الآتية (شكل 72).

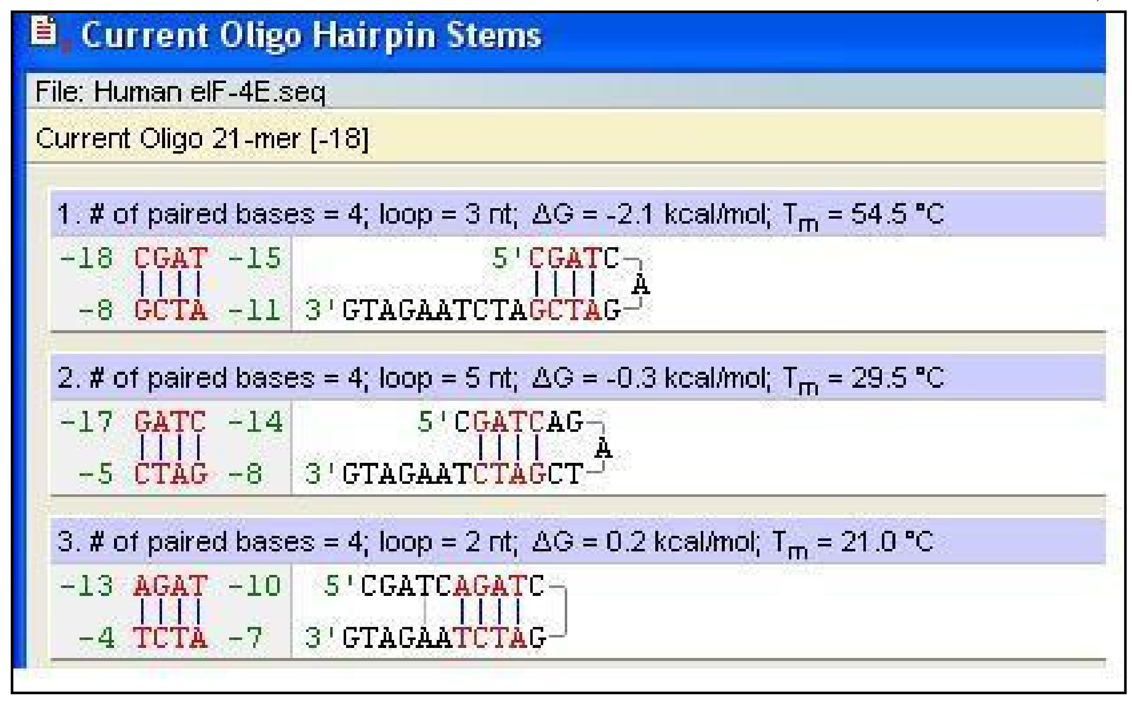


شكل 72 : مزدوجات البوادىء وحالات تحملها

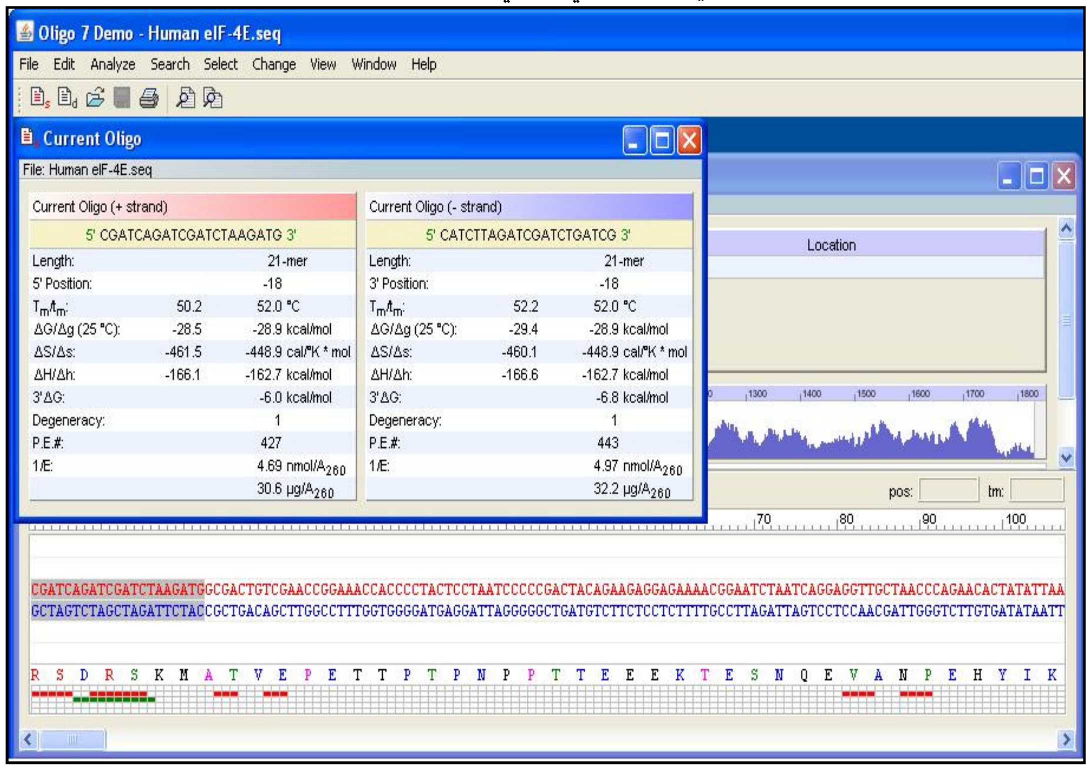
وفضلا عما ذكر أعلاه فان واجهة البرنامج تحوي على إمكانيات أخرى مثل تلك المنضوية تحت إيقونة Analyze (كما في الشكل 73)



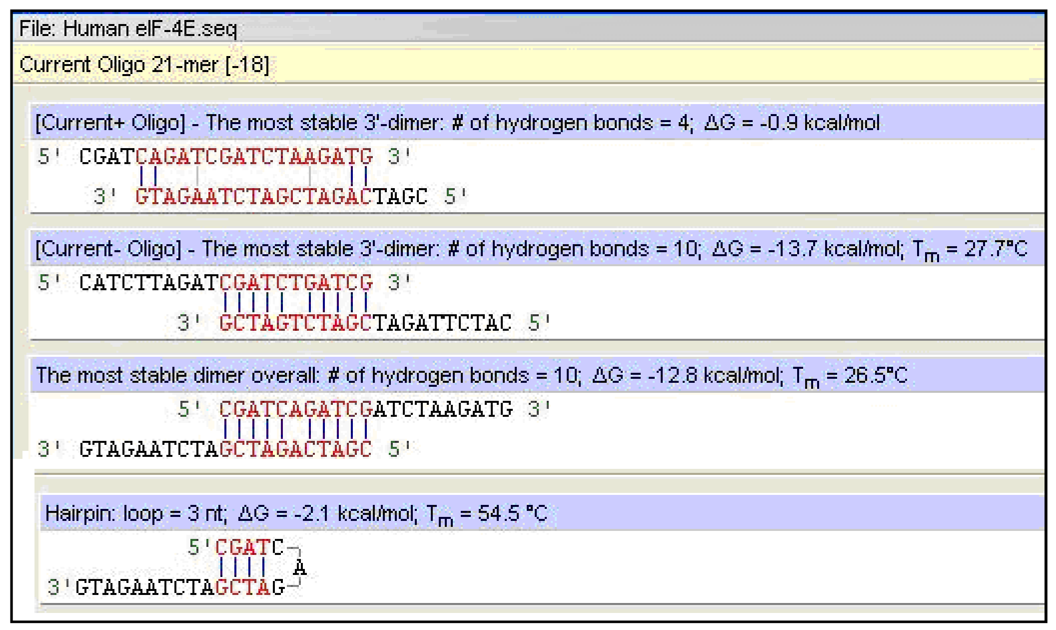
مثل إظهار ماشات الشعر



وإظهار معلومات عامة عن البادىء كما في الآتي



وكذلك حالة تكوين المزدوجات



ويظهر البرنامج درجات انصـهار مختلفة مع ذكـر الطريقـة الـتي حسـبت بهـا وتراكيـز DNA ومحتويات البادىء من القواعد النتروجينية .

File: Human eIF-4E.seq

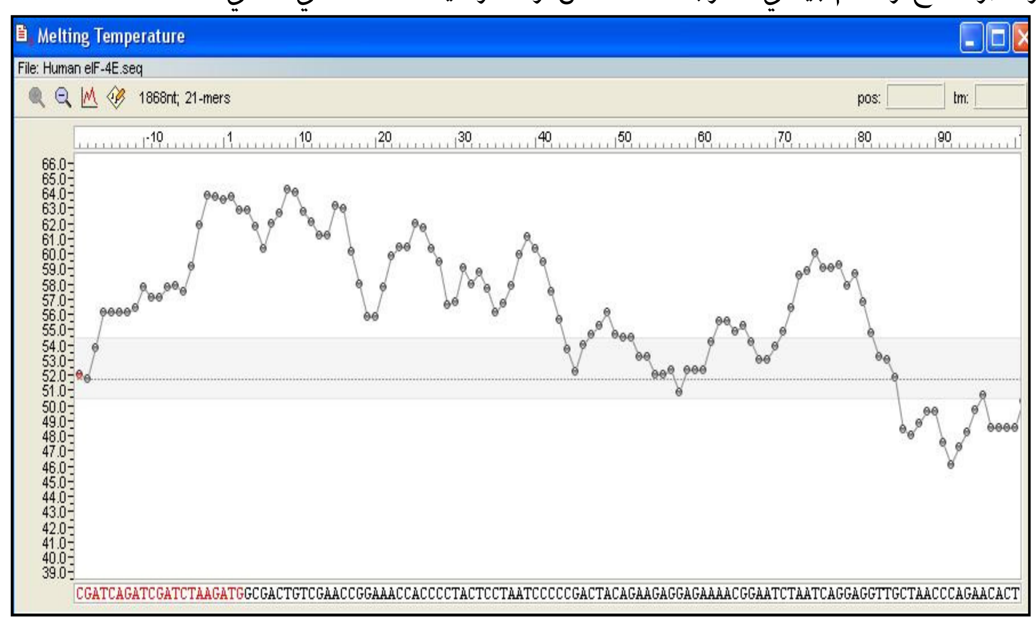
Current Oligo 21-mer [-18]

T_d	61.3°	[nearest neighbor method]
$T_m(+)$	50.2°	[nearest neighbor method]
$T_m(-)$	52.2°	[nearest neighbor method]
T_m	71.4°	[%GC method]
T_m	60°	[2(A+T)° + 4(G+C)° method]
T_m(RNA)[1M Na]	80.4°	[%GC method]
T_m(DNA:RNA)[1M Na]	73.6°	[%GC method]
A_{260}/A_{280}	2.01	[one strand]
Molecular Weight	6.5K	[one strand]
Molecular Weight	13K	[two strands]
µg/OD	47.8	[dsDNA]

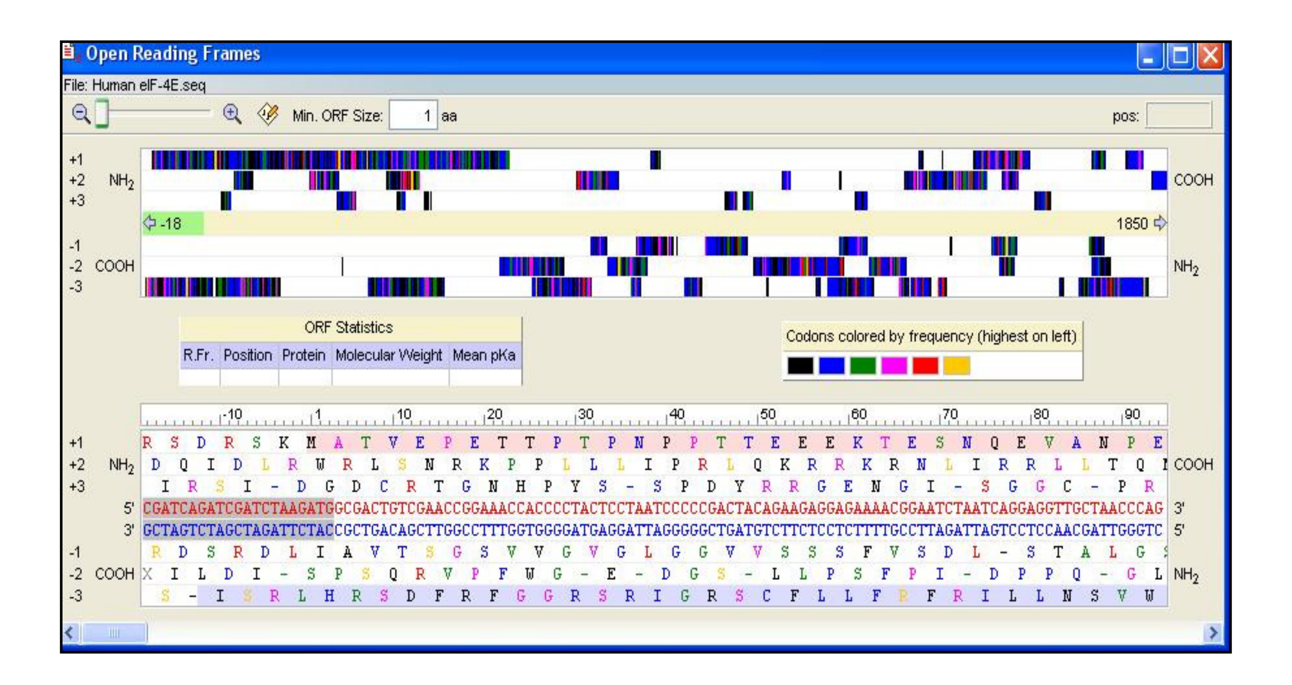
Base	Number & %	
A	7	[33.3%]
C	4	[19.0%]
G	5	[23.8%]
T	5	[23.8%]
A + T	12	[57.1%]
G + C	9	[42.9%]

DNA Melting Temperature in Various Salt and Formamide Concentrations [°C]

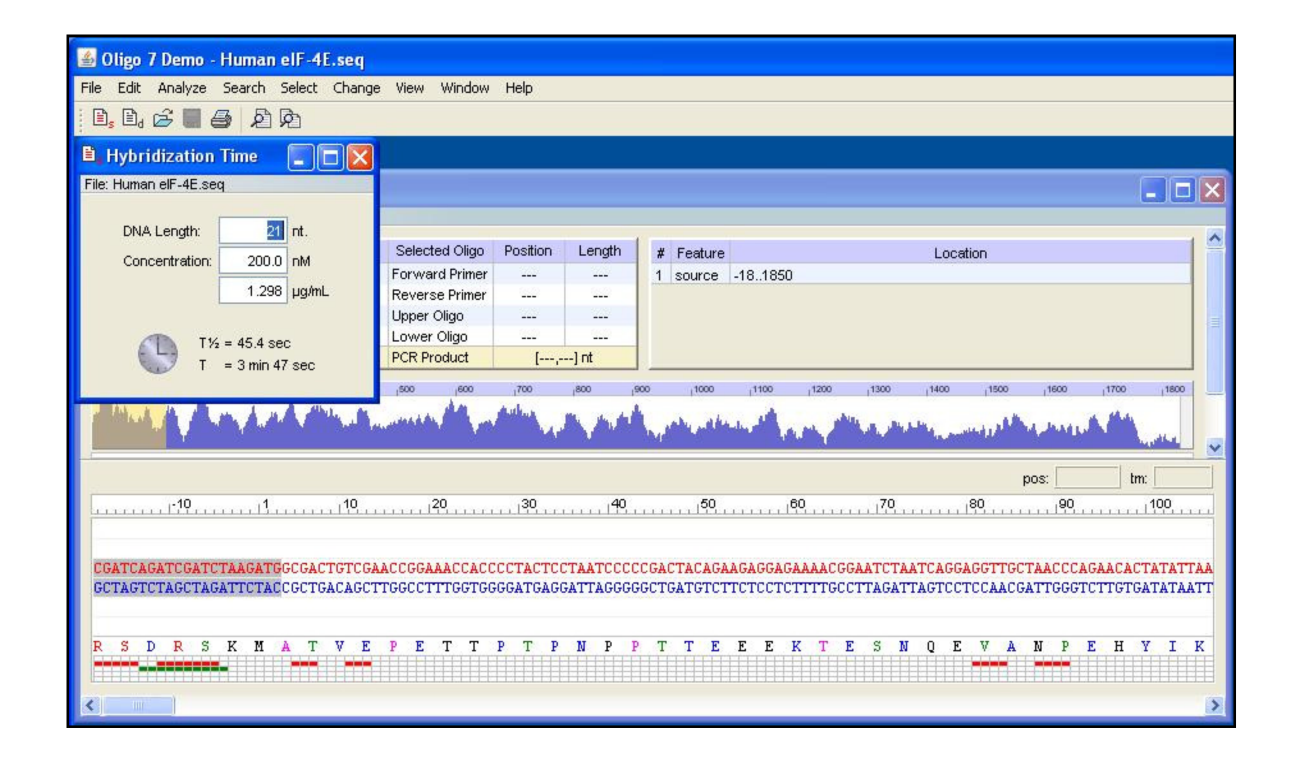
ويظهر البرنامج رسم بياني لدرجات انصـهار التواليات كما في الآتي



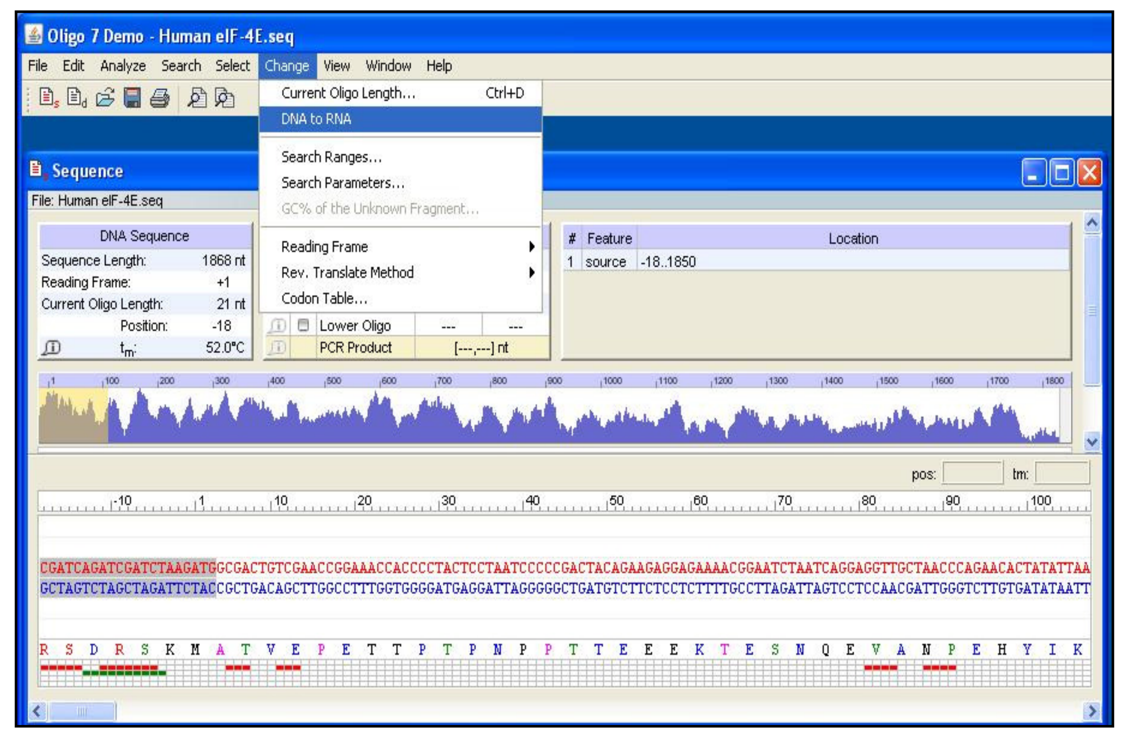
ويساعد البرنامج في التعرف على اطر القراءة المفتوحة في التوالي الهدف المدخل كما في الشكل الآتي :



ويمكن للبرنامج حساب وقت التهجين ضمن فقرة Hybridization time كما موضح في الشكل الآتي



ويحوي البرنامج على إمكانيات أخرى لا تنضوي تحت فقرة التحليل Analysis وإنما تحت فقرة التغيير كما موضح في الآتي



شكل 73 : الإمكانيات المختلفة لبرنامج Oligo7

Optimase Protocol Writer

احد المواقع المهتمة بتفاعلات الكوثرة ، ويهدف الموقع الى ايجاد افضل الطرق لاجراء التفاعل بعد تزويد البرنامج بالبواديء المراد استعمالها وطول الناتج من التفاعل كما موضح في الشكل 74 .

Forward primer sequence:

Reverse primer sequence:

تحوى فقط تواليات البادىء المطابقة للهدف دون اضافات

PCR product length: bp

النواتج تكون بين 150 قاعدة الى 700 قاعدة

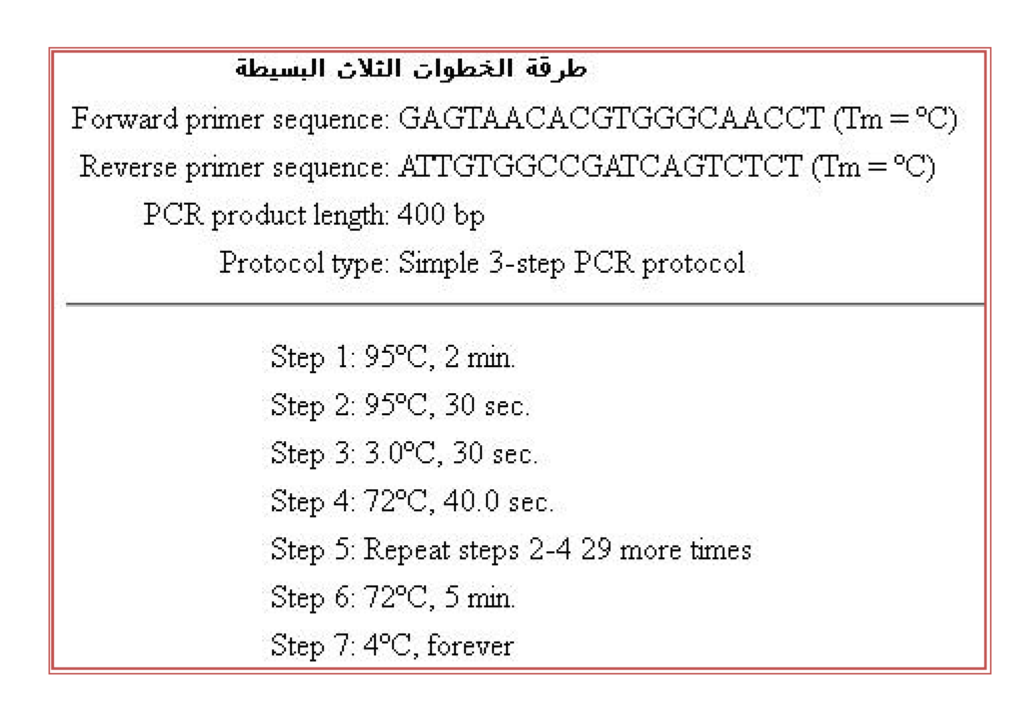
Protocol type: Simple 3-step PCR

اختيار طرق عمل الكوثرة

Develop PCR Protocol

شكل 74 : امكانيات Optimase ProtocolWriter

وقد استعمل مع بواديء خاصة بالبكتريا *Lactobacillus vaginalis* باستعمال الطريقة البسيطة الموضحة في الشل والاخرى الخاصة بطريقة Touchdown التي يوفرها البرنامج كما موضح في الشكل الاتي (شكل 75) :



طرقة الخطوات الثلاث البسيطة

Forward primer sequence: GAGTAACACGTGGGCAACCT (Tm = °C)

Reverse primer sequence: ATTGTGGCCGATCAGTCTCT (Tm = °C)

PCR product length: 400 bp

Protocol type: Simple 3-step PCR protocol

Step 1: 95°C, 2 min.

Step 2: 95°C, 30 sec.

Step 3: 3.0°C, 30 sec.

Step 4: 72°C, 40.0 sec.

Step 5: Repeat steps 2-4 29 more times

Step 6: 72°C, 5 min.

Step 7: 4°C, forever

Touchdown طريقة

Forward primer sequence: GAGTAACACGTGGGCAACCT (Tm = °C)

Reverse primer sequence: ATTGTGGCCGATCAGTCTCT (Tm = °C)

PCR product length: 400 bp

Protocol type: Touchdown PCR protocol

Step 1: 95°C, 2 min.

Step 2: 95°C, 30 sec.

Step 3: 7.0°C decrease 0.5°C per cycle, 30 sec.

Step 4: 72°C, 40.0 sec.

Step 5: Repeat steps 2-4 14 more times

Step 6: 95°C, 30 sec.

Step 7: 0.0°C, 30 sec.

Step 8: 72°C, 40.0 sec.

Step 9: Repeat steps 6-8 19 more times

Step 10: 72°C, 5 min.

Step 11: 4°C, forever

شكل 75 : الطرق المقترحة من قبل Optimase Protocol Writer لاجراء تفاعلات الكوثرة .

جودة برامج تصميم البواديء

أصبح الحاسوب وسيلة أساسية في دراسة البايولوجي الجزيئي من مختلف النواحي ، فبهذه الوسيلة يمكن ترتيب وتوزيع وجمع وخزن البيانات واستردادها من القواعد الخاصة بها لتمكن من الإجابة على الكثير من الأسئلة الصعبة التي لا يمكن للقدرات البشرية جمعها وتحليلها دون مساعدة ، وبهذا أصبح للمعلوماتية الحيوية Bioinformatics بما تقدمه من برامج وإيجاد قواعد بيانات ووسائل اتصال بينها ضروريا ، اذ تمثل الالتقاء بين العلوم الحيوية وعلوم الحاسوب . فالبرامج مهمة في اختيار البواديء لتفاعلات الكوثرة PCR (وهو الجانب الذي تناوله هذا الكتاب) ووسائل أخرى لتحديد التواليات التي يكون تفاعل الكوثرة الأساس فيها ، وكذلك توفير المجسات للدراسات الأخرى .

ومن المعروف ان البادىء غير الجيد يمكن ان يؤدي الى إجهاض تفاعلات الكوثرة على كافة الأصعدة . وهناك العديد من البرامج المستعملة لاختيار البواديء من توالي القالب (Template DNA) ، وتوجد عدة وسائل Online tools تساعد في تصميم البواديء المطروحة على شبكة الانترنيت او الشبكة العنكبوتية وتكون ذات روابط مع أجزاء الشبكة للمساعدة . وكثرة البرامج المتوفرة لتحديد البواديء واختيارها تشير الى ضرورة وأهمية تفاعلات الكوثرة في الدراسات الجزيئية الحديثة . وهذه البرامج تساعد لكن لا تلغي دور البايولوجي ، ويجب تحديد صلاحيتها باستعمال انطباع المستخدم Common sense والعمل التجريبي للبواديء المصممة قبل استعمالها .

لذلك فان العديد من البرامج تقلل من أعداد البواديء المحتملة لتحسين نوعية البادىء وذلك باستبعاد المناطق الحاوية على المكررات واستبعاد المناطق التي فيها نسبة مرتفعة لقواعد GC (مثل 80٪) او نسب واطئة (20٪) والعناية بطول الهدف .

الاختلاف بين البرامج في نتائج تصميم البواديء

البرامج المستخدمة في تصميم البواديء لا تظهر في مخرجاتها بواديء متطابقة حتى وان كانت المؤشرات الأساسية المدرجة في مدخلاتها هي نفسها ، وذلك بسبب اختلاف الخوارزميات التي صممت هذه البرامج على أساسها ، من حيث طرق الحسابات المستعملة فيها وترتيب أولويتها وأهميتها في تلك الخوارزميات . فمثلا برنامج Primer3 الذي يعد الأفضل (في الوقت الحاضر على الأقل) يستعمل اصطفافا مستند الى مصفوفة Smith-Waterman alignment –based metrics لحدس إمكانية ارتباط البادىء الى نفسه او الى بادئ آخر فيستبعد بعضا من البواديء المحتملة .

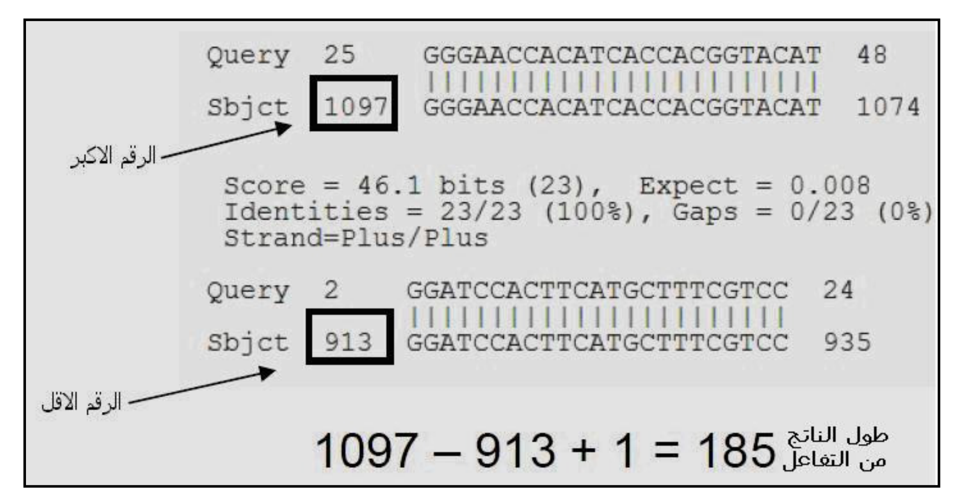
لذلك كان من الضروري فهم الآلية التي يعمل بها البرنامج المستعمل والذي ينشر عادة على شكل بحوث موثقة وهذا الفهم سيؤدي الى الحصول على اكبر فائدة ممكنة من

البرنامج . فهناك العديد من البرامج تختلف في سهولة استعمالها بالنسبة للمستخدم ، وتوجد منها التجارية والأخرى للأغراض الأكاديمية وتكون المنافسة شديدة في هذا المجال .
والبرامج تهدف الى تصميم البواديء بعد الأخذ بنظر الاعتبار عاملين مهمين هما التخصصية والكفاءة في التضخيم باستعمال عدة طرق لغرض التقليل من عدد البواديء المصممة الممكنة التي يجب ان يدرسها البرنامج وبضمنها البواديء الجيدة . وهنا يأتي الاختلاف بين البرامج فمثلا احد البرامج يعتبر ان البواديء جيدة اعتمادا على احتواء الطرف '3 على CG، GC، GG.CC التي تزيد من احتمالية كفاءة عملية ارتباط البادئ مع جزيئة الهدف تاركا للمستخدم تحديد المؤشرات الأخرى . اما التخصص فبعض البرامج تعمد الى حساب تردد حدوث انطباق خاطئ Mispriming ومنها ينتج ان بعض البواديء تكون ذات تخصص عالي وأخرى ضعيفة التخصص تؤدي الى إنتاج النواتج المطلوبة لكن مع نواتج أخرى لا علاقة لها بالغرض من إجراء عملية الكوثرة . اما الكفاءة فيأخذها البرنامج على انها قابلية البادئ على تضخيم النواتج الى حالة الأمثلة النظرية بزيادة التضاعف لكل دورة من دورات PCR . و كلا التوجهين يؤديان في العديد من الأحيان الى خسران البواديء الجيدة ، فعند إدخال توالي معين الى برنامج الحاسوب فان البرنامج يحاول إجراء الموازنة بين الهدفين المذكورين (التخصصية والكفاءة) وذلك باستعمال مؤشرات اختيرت مسبقا للتغايرات في تصميم البادئ التي لها الدور الأكبر سواء في التخصص او الجودة لعملية التضخيم ، وبالنتيجة يلاحظ ان البرنامج يعطي أكثر من زوج من البواديء والبعض يعطي عشرات الاختيارات التي يمكن ان تلاؤم عددا من الظروف التي يعتقد المستخدم انها مهمة ، ومن الضروري ذكر ان البرامج تهدف الى زيادة التوازن الكيماوي للتفاعل لأنه في العديد من تفاعلات الكوثرة تتزاحم المواد للارتباط الى القطعة غير مرتبطة (كما في ارتباط البواديء الى مواقع محددة من تواليات الهدف) ، وتحدد تركيز كل مادة عند التوازن الحراري وهي التي تظهر في مخرجات البرنامج ، فبعض البرامج تنتج العديد من البواديء لذا يلجأ الى وضع أنظمة التصفية Filters لتفرز وتصفي البواديء اعتمادا على اعتبارات خاصة أهمها الطاقة وبذا ترفض البواديء التي لا تلبي الحاجة .
ويعتقد ان البرامج الأفضل هي التي توفر الإمكانات الأقل لتغير الظروف . فزيادة مدى المؤشرات المستعملة للاختيار تزيد من الوقت اللازم للبحث والتقاط البادئ لذلك يجب ان تحدد وتضاف الى القيم المخزونة في البرنامج وهذا التقليص يقلل من الوقت وكذلك يعطي بواديء جيدة . وعلى سبيل المثال لا الحصر اذا تم تحديد درجة حرارة الالتحام والتي تكون محددة من قبل البرنامج بأي من الطرق السالف ذكرها مثل استعمال طريقة الجوار

الأقرب (وهي الأكثر دقة) او استعمال معادلة والاس Wallace formula للعمليات العامة ، فبعض البرامج تحدد حساباتها على مدى اكبر من 100 نيوكليوتيد . اذا تم تحديد الدرجة بقدر 60°م فان هذا سيؤثر في حسابات البرنامج ويعطي بوادىء مختلفة للتوالي المستهدف ، وكذلك الحال عند تحديد طول البادىء او نسبة الكوانين والسايتوسين GC٪ التي تؤثر في درجات الحرارة وبالتالي تعطي بوادىء مختلفة .
ان كل التقييدات والمحددات المذكورة أعلاه سواء كانت في صلب تصميم البرنامج او إملاء من المستخدم يمكن التخلي عنها بعض الشيء في حالات خاصة كما في حالة البحث عن بوادىء ثابتة جداً لتواليات عديدة من أنواع كائنات مختلفة او عند تصميم البوادىء المشتتة مستخلصة من تواليات البروتينات . ومن جهة ثانية فان التجارب او الإجراءات العملية يمكن ان تغير عند استعمال البوادىء وقيمها الأصلية المرفقة كمواصفات للبادىء ، فمثلا في التشخيص الطبي يُزاد في التخصصية على حساب الكفاءة لتجنب النتائج الموجبة الخاطئة (False positive) وذلك لان العملية تهدف الى التشخيص وليس الحصول على كميات كبيرة من النواتج فقط .

مؤشرات الجودة

تعد البرامج الواقعية Virtual PCR programs هي الأفضل وهي التي تقبل أملاءات المستخدم (ولكن الى حد ما) وتعمل على إيجاد التشابه باستعمال NCBI BLAST لتحديد التوالي في قواعد البيانات العامة . عند وضع الأسس لكتابة خوارزمية او شفرة اي برنامج لابد الأخذ بنظر الاعتبار البيانات التجريبية اي نتائج التجارب العملية . وبذلك فان البرامج تكون أفضل عندما تكون فيها المؤشرات القابلة للتعديل اقل والباقي المفروض ان تكون محسوبة من قبل البرنامج لتسهيل استعماله .
ومن المعروف ان طول البادىء الذي سيحدد من قبل البرنامج يكون مهما في تحديد المؤشرات الأخرى مثل طول النواتج ، ودرجة انصهارها والحاصل اي الكميات التي يمكن الحصول عليها ، ولذا فصفة الطول يمكن ان تؤثر في المخرجات . ومن الجدير بالذكر ان بعض البرامج تعطي طول النواتج في المخرجات وفي حالة عدم حدوث ذلك فيمكن تحديده وفق الآتي شكل 76 :



شكل 76 : حساب طول الناتج

ولتقييم جودة البوادىء يكون تحديد الكفاءة النهائية هي المحك الأساسي في التحري عن البوادىء الملائمة (في اغلب العمليات وليس كلها كما ذكر أعلاه) وأفضل تحديد للكفاءة يعتمد على قياس الطاقة التي يتم بواسطة حذف البوادىء غير الملائمة وهذه يجب ان تتم باستعمال البرمجة الداينميكية لأنها أكثر انضباطا من استعمال الطرق السريعة Heuristic methods . والعديد من البرامج تستعمل كشافات خاصة وجاهزة Precomputed indexes التي تمكن من تحديد الطرف '3 للبادئ فيما اذا كانت موجودة في خلفية كبيرة من DNA الجينومي ، وفي العادة تحدد التخصصية بمقدار 16 قاعدة بدءا من النهاية '3 .

وفي جميع الأحوال يكون التقييم الأساسي والنهائي هو العمل التجريبي . ولابد من ذكر ان عملية تصميم البوادىء لا تزال تفتقر الى العديد من الجوانب التي لم تكتشف بعد وبطبيعة الحال تعتمد على الهدف المراد تضخيمه وكذلك الهدف من عملية التضخيم ، فوجود مناطق التواليات المتكررة والتي تشكل نسبة عالية من جينومات اللبائن تمثل إحدى وجوه الجوانب الغامضة .

ولتحديد النوعية او الجودة لتقييم البوادىء تم ربط قياسات النوعية Quality metrics لتعطي قيمة او درجة نهائية تستعمل المجموع الموزون Weighted sum (في علوم الإحصاء) . ودرجات القياس هذه تأخذ بنظر الاعتبار درجة انصهار البادىء وثبوت الحرارة الحركي Thermodynamic stability للبادي عند النهاية '3 ومؤشرات أخرى تحدث أثناء تفاعلات PCR وبذا فان هناك عدة قياسات تؤخذ بنظر الاعتبار عند حدس جودة البادىء وان ثقل كل قياس يدخل في تحديد النوعية يجب ان يحدد لغرض الحصول على الدرجة النهائية للبادئ .

واختبار قياسات الجودة تواجهها نوعين من الصعوبات :

- ان هذه القياسات ليست متاحة دائما للتوضيح والتفسير الفيزيائي .
- يمكن ان تكون كثيرة ومكررة Redundant .

فمن قياسات النوعية والتي تدخل في التقييم الإحصائي النهائي Max-complementarity metrics و Max 3'-complementarity metrics والفرق بين هاتين الخاصيتين هي ان الأولى تحدد التشابه العام بين اثنين من تواليات البادىء (الأمامي والعكسي) والثانية تأخذ بنظر الاعتبار التشابه الموجود بين أخر 5-7 من القواعد الأخيرة في الطرف '3 وفق تقيم اصطفاف Smith-Waterman alignment score ويكون انتخاب الترجيح ليس سهلا ، فعلى سبيل المثال عند استخدام برنامج Primer3 له 25 قيمة للترجيح التي يجب ان تكون منطقية حتى يقوم بتصميم البادىء .

مواقع بعض البرامج المتوفرة على شبكة الانترنيت

هناك العديد من البرامج المتوفرة البعض منها خاص بمؤسسات مثل Primer Biosoft ، والأخرى شخصية . البعض منها يوفر اتصالات وروابط الى مواقع مفيدة ولكن في الغالب تفقد البرامج هذه الخاصية وتصبح غير فعالة . كما ان بعض البرامج تختفي من على الشبكة العنكبوتية نظرا لعدم جودتها او لقلة استخدامها . وهنالك العديد من البرامج ذات الإصدارات المختلفة والإصدارات الجديدة منها تعالج نقصا كان في الإصدارات السابقة له .

جدول 5 : البرامج المتوفرة على شبكة الانترنيت تحت مزودات Servers مكنة

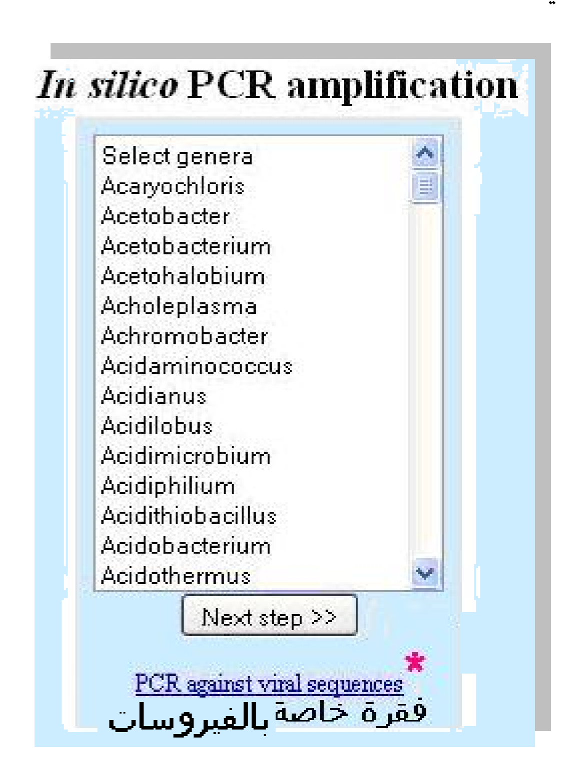
PROGRAM	WEB SITE
Anaze oligolynucleotide duplexes	http://www.fermentas.com/reviewer/app?page=DuplexAnalysis&service=page
antisense primers	http://eu.idtdna.com/Scitools/Applications/AntiSense/Antisense.aspx
AutoPrime	http://www.autoprime.de/AutoPrimeWeb
BatchPrimer3	http://probes.pw.usda.gov/batchprimer3/index.html
cDNA Primers	http://pcrsuite.cse.ucsc.edu/cDNA_Primers.html
CODEHOP	http://blocks.fhcrc.org/codehop.html http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/codehop.htm
iCODEHOP	.http://dbmi-icode-01.dbmi.pitt.edu/i-codehop-context/
ExonPrimer	http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/ExonPrimer.html
GeneFisher2	http://bibiserv.techfak.unibielefeld.de/genefisher2/submission.html
Genomic Primers	http://pcrsuite.cse.ucsc.edu/Genomic_Primers.html
GENOPLANTE	http://urgi.versailles.inra.fr/spads/spads.html
GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design	https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer
Getprime	http://updepla1srv1.epfl.ch/getprime
JCSG Primer Selection Too	http://www.jcsg.org/scripts/prod/primer/primer_input_form.cgi
MELTING 4.1f	http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::melting
MethPrimer	http://www.urogene.org/methprimer/index1.html
MPprimer	/http://biocompute.bmi.ac.cn/MPprimer
MPprimer	http://biocompute.bmi.ac.cn/MPprimer/
mPrimer3	/http://bioinfo.ut.ee/mprimer3
MultiRevTrans	http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/SMS/multi_rev_trans.html
Multi-Objective Multiplex PCR Design Version 3.0	http://apps.diatomsoftware.com/muplex/html/MuPlex.html
MuPlex	http://apps.diatomsoftware.com/muplex/html/MuPlex.html
Olig7	http://www.oligo.net/demo-downl.html
OligoWiz 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/OligoWiz
Overlapping Primersets	http://pcrsuite.cse.ucsc.edu/Overlapping_Primers.html
PCR Designer: for Restriction Analysis of Sequence Mutations	http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer.html
PCR Now	http://pathogene.vbi.vt.edu/rt_primer
PCR Now TM	/http://pathogene.vbi.vt.edu/rt_primer

PCRTiler v1.42	http://pcrtiler.alaingervais.org:8080/PCRTiler
PRIDE	http://ibios.dkfz.de/tbi_old/services/Pride/search_primer
PriFi	http://cgi-www.daimi.au.dk/cgi-chili/PriFi/main
Primaclade	https://131.204.120.103/srsantos/primaclade/primaclade.cgi http://www.umsl.edu/services/kellogg/primaclade.html
Primer Premier	http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/index.html
Primer3	http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi
Primer3Plus	http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi
Primer-BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=NcbiHomeAd
PrimerQuest	http://biotools.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index
PrimerQuest^{SM}	http://eu.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/default.aspx
PrimerStation	http://ps.cb.k.u-tokyo.ac.jp/index.html
primerX	/http://www.bioinformatics.org/primerx
Primerx	http://www.bioinformatics.org/primerx/cgi-bin/protein_1.cgi
Primique	http://cgi-www.daimi.au.dk/cgi-chili/primique/front.py
Primo Degenerate 3.4: Degenerate PCR Primer Design	http://www.changbioscience.com/primo/primod.html
PriFi	http://cgi-www.daimi.au.dk/cgi-chili/PriFi/main
Primo Multiplex 3.4	http://www.changbioscience.com/primo/primoml.html
Primo Pro 3.4	http://www.changbioscience.com/primo/primo.html
primou	http://www.changbioscience.com/primo/primou.html
ProbeWiz	http://www.cbs.dtu.dk/services/DNAarray/probewiz.php
qPrimerDepot	http://primerdepot.nci.nih.gov
QuantPrime	/http://www.quantprime.de
RAPD-primer generator	http://www2.uni-jena.de/biologie/mikrobio/tipps/rapd.html
Sequence Extractor	http://bioinformatics.org/seqext/
Sequence Manipulation Suite	http://www.bioinformatics.org/sms2/primer_map.html
Sequence Manipulation Suite	http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html
Sequencing Primer Design	http://www.changbioscience.com/primo/primoseq.html
siRNA Design Software	http://i.cs.hku.hk/~sirna/software/sirna.php
siRNA Design Software	http://i.cs.hku.hk/~sirna/software/sirna.php
SNP Primers	http://pcrsuite.cse.ucsc.edu/SNP_Primers.html
Universal dilution and mixing two	http://primerdigital.com/tools/UniDilution.html

solutions calculator	
Xpression Primer	http://www.premierbiosoft.com/expression/index.html
cDNA primers	http://pcrsuite.cse.ucsc.edu/cDNA_Primers.html
Genomic primers	http://pcrsuite.cse.ucsc.edu/Genomic_Primers.html
SNP primers	http://pcrsuite.cse.ucsc.edu/SNP_Primers.html
VizPrimer	/http://biocompute.bmi.ac.cn/CZlab/VizPrimer
Overlapping primers	http://pcrsuite.cse.ucsc.edu/Overlapping_Primers.html
AutoDimer	http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/AutoDimerHomepage/AutoDimerProgramHomepage.htm
الحاسبات	
Calculators	http://www.fermentas.com/reviewer/app?page=Calculator&service=external&sp=Sconcentrations
BioMath Calculators	http://www.promega.com/techserv/tools/biomath/calc07.htm
Nucleic Acids Calculator	http://www.kenkyuu.net/js/nacalc.html
OD260 Nucleotide Concentration Calculator	http://endmemo.com/bio/OD260.php
OligoCalc	http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html http://www.justbio.com/index.php?page=oligocalc http://www.sciencelauncher.com/oligocalc.html
Oligo Calculator	http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html
OligoAnalyzer 3.1	http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer
Oligonucleotide properties	http://www.fermentas.com/reviewer/app?page=OligoProperties&service=page
PCR Box Titration Calculator	http://www.attotron.com/pub/pcrtitr.htm
مواقع خاصة	
PrimerBank	http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank
The PCR Encyclopedia	/http://www.pcr-encyclopedia.com
Primer Design and Search Tool	**http://bisearch.enzim.hu/?m=search**
MethPrimer	**http://www.urogene.org/methprimer/index1.html**
primerStation	http://ps.cb.k.u-tokyo.ac.jp/index.html primerStation
AutoPrime	**http://www.autoprime.de/AutoPrimeWeb**
GenScript	**http://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer**
GenScript	**http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/sequencing_primer_design**
PathoGene	**/http://pathogene.vbi.vt.edu**

In Silico PCR amplification

ويلحق بالبرامج المذكورة مواقع خاصة للتأكد وتقييم البوادئ وهو موقع *In Silico* PCR amplification (http://insilico.ehu.es/PCR/index.php) وهو من المواقع التي ساهمت بها المعلوماتية الحيوية فهو موقع متعدد الأغراض (ويعامل مع البكتريا بشكل رئيس) . فهو بداية يستعمل في فحص البوادئ والتأكد منها . وواجهة البرنامج موضحة في الشكل الآتي (شكل 77)



شكل 77 : واجهة الموقع *In Silico* PCR amplification

* هذه الفقرة خاصة بالفيروسات حيث ان الموقع كما ذكر في مستهل الموضوع خاص بالبكتريا ، والاستثناء يقع تحت هذه الفقرة . ويحوي الموقع عند نهاية 2010 على حوالي 1783 توالي من 1421 فيروس تم تحديد تواليتها . وتعامل وفق المخطط

In silico PCR amplification against sequenced viruses

1783 sequences from 1421 completely sequenced viruses (last update: 2010/05/31)

Primer 1[1] 5'- -3' C
Primer 2[1] 5'- -3' C

Allow 0 mismatches, but in 1 nucleotides in 3' end

[1] Degenerated nucleotides are allowed; A+T+G+C must be 10 or more.

Info

Find Reset

وبالعودة الى البكتريا فيتم اختيار جنس البكتريا للانتقال الى الخطوة القادمة كما موضح في الآتي (شكل 78) :

In silico PCR amplification

Input primers in fasta format

Primer 1[1] 5'- -3' C
Primer 2[1] 5'- -3' C

Migroorganism

Helicobacter pylori 26695

Include plasmids (if available)

Allow 0 mismatches, but in 1 nucleotides in 3' end

Maximum length of bands

3000 nucleotides

[1] Degenerated nucleotides are allowed; A+T+G+C must be 10 or more.

Info

Amplify Reset

شكل 78 : استعمال البرنامج ***In Silico* PCR amplification**

و تلصق البوادىء في الأماكن المخصصة لها ، ويتم اختيار النوع البكتيري المراد فحص البادىء له ، اما اذا كان الغرض عام يمكن استعمال الاختيار الأخير وهو All strains

In silico PCR amplification

Input primers in fasta format

Primer 1[1] 5'- -3' C

Primer 2[1] 5'- -3' C

وضع البوادىء المراد اختبارها

Migroorganism

Helicobacter pylori 26695 اختيار الكائن

اذا كان التحري عام يتم استعمال الاختيار الاخير All strains

Include plasmids (if available)

Allow 0 mismatches, but in 1 nucleotides in 3' end

Maximum length of bands

3000 nucleotides

[1] Degenerated nucleotides are allowed; A+T+G+C must be 10 or more.

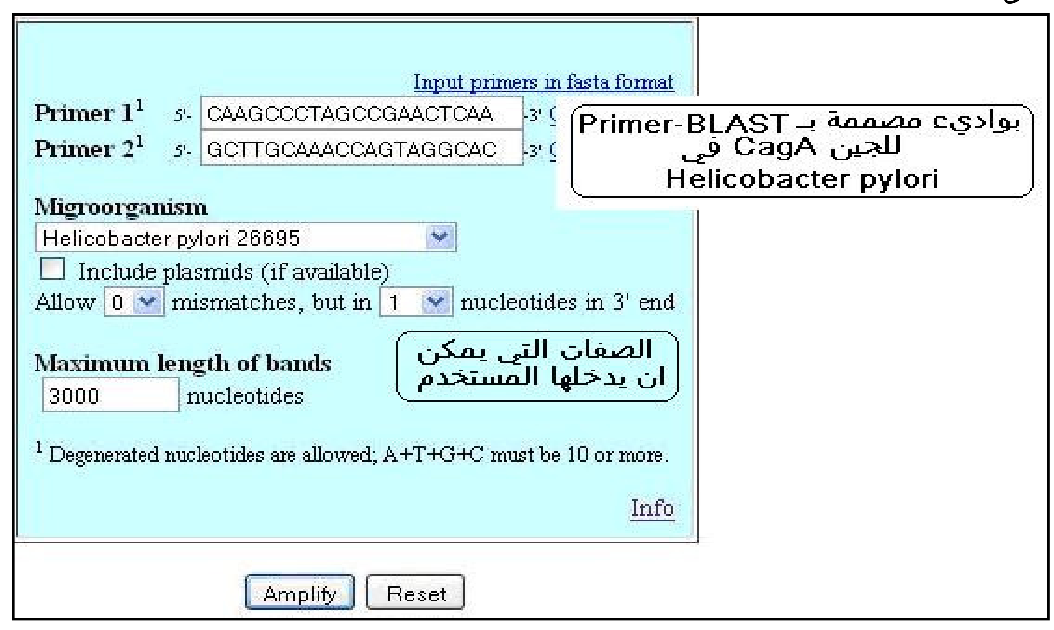
Amplify Reset

واستعمل البرنامج للبكتريا *Helicobacter* التي تحوي قاعدة بيانات البرنامج على 46 سلالة ، وقد اختير في هذه الفقرة تواليات سم CagA للبكتريا *Helicobacter pylori* الموضح في الفقرة الاتية

>*Helicobacter pylori*
ATGACCAACGAAACCATTGATCAGACCCGTACCCCGGATCAGACCCAGAGCCAGACCGCGTTTGATCCGCAGCAGTTTATTAACAACCTGCAGGTGGCGT
TTATTAAAGTGGATAACGTGGTGGCGAGCTTTGATCCGGATCAGAAACCGATTGTGGATAAAAACGATCGTGATAACCGTCAGGCGTTTGATGGCATTAG
CCAGCTGCGTGAAGAATATAGCAACAAAGCGATTAAAAACCCGACCAAAAAAAACCAGTATTTTAGCGATTTTATTGATAAAAGCAACGATCTGATTAACA
AAGATAACCTGATTGATGTGGAAAGCAGCACCAAAAGCTTTCAGAAATTTGGCGATCAGCGTTATCAGATTTTTACCAGCTGGGTGAGCCATCAGAAAGA
TCCGAGCAAAATTAACACCCGTAGCATTCGTAACTTTatgGAAAACATTATTCAGCCGCCGATTCCGGATGATAAAGAAAAAGCGGAATTTCTGAAAAGCG
CGAAACAGAGCTTTGCGGGCATTATTATTGGCAACCAGATTCGTACCGATCAGAAATTTatgGGCGTGTTTGATGAAAGCCTGAAAGAACGTCAGGAAGC
GGAAAAAAACGGCGGCCCGACCGGCGGCGATTGGCTGGATATTTTTCTGAGCTTTATTTTTAACAAAAAACAGAGCAGCGATGTGAAAGAAGCGATTAA
CCAGGAACCGGTGCCGCATGTGCAGCCGGATATTGCGACCACCACCGATATTCAGGGCCTGCCGCCGGAAGCGCGTGATCTGCTGGATGAACGTGG
CAACTTTAGCAAATTTACCCTGGGCGATatgGAAatgCTGGATGTGGAAGGCGTGGCGGATATTGATCCGAACTATAAATTTAACCAGCTGCTGATTCATAA
CAACGCGCTGAGCAGCGTGCTGatgGGCAGCCATAACGGCATTGAACCGGAAAAAGTGAGCCTGCTGTATGCGGGCAACGGCGGCTTTGGCGATAAACA
TGATTGGAACGCGACCGTGGGCTATAAAGATCAGCAGGGCAACAACGTGGCGACCCTGATTAACGTGCATatgAAAAACGGCAGCGGCCTGGTGATTGC
GGGCGGCGAAAAAGGCATTAACAACCCGAGCTTTTATCTGTATAAAGAAGATCAGCTGACCGGCAGCCAGCGTGCGCTGAGCCAGGAAGAAATTCGTAA

```
CAAAGTGGATTTTatgGAATTTCTGGCGCAGAACAACACCAAACTGGATAACCTGAGCGAAAAAGAAAAAGAAAAATTTCAGAACGAAATTGAAGATTTTC
AGAAAGATAGCAAAGCGTATCTGGATGCGCTGGGCAACGATCGTATTGCGTTTGTGAGCAAAAAAGATACCAAACATAGCGCGCTGATTACCGAATTTAA
CAACGGCGATCTGAGCTATACCCTGAAAGATTATGGCAAAAAAGCGGATAAAGCGCTGGATCGTGAAAAAAACGTGACCCTGCAGGGCAGCCTGAAACA
TGATGGCGTGatgTTTGTGGATTATAGCAACTTTAAATATACCAACGCGAGCAAAAACCCGAACAAAGGCGTGGGCGCGACCAACGGCGTGAGCCATCTG
GAAGCGGGCTTTAACAAAGTGGCGGTGTTTAACCTGCCGGATCTGAACAACCTGGCGATTACCAGCTTTGTGCGTCGTAACCTGGAAAACAAACTGACCG
CGAAAGGCCTGAGCCTGCAGGAAGCGAACAAACTGATTAAAGATTTTCTGAGCAGCAACAAAGAACTGGCGGGCAAAGCGCTGAACTTTAACAAAGCGG
TGGCGGAAGCGAAAAGCACCGGCAACTATGATGAAGTGAAAAAAGCGCAGAAAGATCTGGAAAAAAGCCTGCGTAAACGTGAACATCTGGAAAAAGAA
GTGGAAAAAAAACTGGAAAGCAAAAGCGGCAACAAAAACAAAatgGAAGCGAAAGCGCAGGCGAACAGCCAGAAAGATGAAATTTTTGCGCTGATTAAC
AAAGAAGCGAACCGTGATGCGCGTGCGATTGCGTATACCCAGAACCTGAAAGGCATTAAACGTGAACTGAGCGATAAACTGGAAAAAATTAGCAAAGAT
CTGAAAGATTTTAGCAAAAGCTTTGATGAATTTAAAAACGGCAAAAACAAAGATTTTAGCAAAGCGGAAGAAACCCTGAAAGCGCTGAAAGGCAGCGTG
AAAGATCTGGGCATTAACCCGGAATGGATTAGCAAAGTGGAAAACCTGAACGCGGCGCTGAACGAATTTAAAAACGGCAAAAACAAAGATTTTAGCAAA
GTGACCCAGGCGAAAAGCGATCTGGAAAACAGCGTGAAAGATGTGATTATTAACCAGAAAGTGACCGATAAAGTGGATAACCTGAACCAGGCGGTGAG
CGTGGCGAAAGCGatgGGCGATTTTAGCCGTGTGGAACAGGTGCTGGCGGATCTGAAAAACTTTAGCAAAGAACAGCTGGCGCAGCAGGCGCAGAAAAA
CGAAGATTTTAACACCGGCAAAAACAGCGAACTGTATCAGAGCGTGAAAAACAGCGTGAACAAAACCCTGGTGGGCAACGGCCTGAGCGGCATTGAAGC
GACCGCGCTGGCGAAAAACTTTAGCGATATTAAAAAAGAACTGAACGAAAAATTTAAAAACTTTAACAACAACAACAACGGCCTGAAAAACAGCACCGAA
CCGATTTATGCGAAAGTGAACAAAAAAAAAACCGGCCAGGTGGCGAGCCCGGAAGAACCGATTTATACCCAGGTGGCGAAAAAAGTGAACGCGAAAAT
TGATCGTCTGAACCAGATTGCGAGCGGCCTGGGCGGCGTGGGCCAGGCGGCGGGCTTTCCGCTGAAACGTCATGATAAAGTGGATGATCTGAGCAAAGT
GGGCCTGAGCGCGAGCCCGGAACCGATTTATGCGACCATTGATGATCTGGGCGGCCCGTTTCCGCTGAAACGTCATGATAAAGTGGATGATCTGAGCAA
AGTGGGCCGTAGCCGTAACCAGGAACTGGCGCAGAAAATTGATAACCTGAACCAGGCGGTGAGCGAAGCGAAAGCGGGCTTTTTTGGCAACCTGGAAC
AGACCATTGATAAACTGAAAGATAGCACCAAAAAAAACGTGatgAACCTGTATGTGGAAAGCGCGAAAAAAGTGCCGGCGAGCCTGAGCGCGAAACTGG
ATAACTATGCGATTAACAGCCATACCCGTATTAACAGCAACATTCAGAACGGCGCGATTAACGAAAAAGCGACCGGCatgCTGACCCAGAAAAACCCGGA
ATGGCTGAAACTGGTGAACGATAAAATTGTGGCGCATAACGTGGGCAGCGTGAGCCTGAGCGAATATGATAAAATTGGCTTTAACCAGAAAAACatgAAA
GATTATAGCGATAGCTTTAAATTTAGCACCAAACTGAACAACGCGGTGAAAGATATTAAAAGCGGCTTTACCCATTTTCTGGCGAACGCGTTTAGCACCGG
CTATTATTGCCTGGCGCGTGAAAACGCGGAACATGGCATTAAAAACGTGAACACCAAAGGCGGCTTTC
```

وصممت لهذا التوالي بواديء باستعمال Primer BLAST ، وأريد فحص بعض البـواديء بالتطبيق أعلاه



شكل 79 : استعمال البرنامج لفحص احد البواديء لسم *Helicobacter pylori* وهو CagA

والنتائج أوضحت ان البادىء صالح لبعض السلالات كما موضح في الشكل الآتي (80)
:

insilico.ehu.es/PCR/Amplify_show_result.php?uYRp1JkTc2Tq7GK

Most Visited Getting Started Customize Links Free Hotmail Windows Market

Search dictionaryBo

32 - Helicobacter pylori PeCan18

للتعرف على البكتريا او السلالات

11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
No bands	No bands			No bands	No bands	No bands	No bands	No bands	No bands		No bands

100 bp DNA ladder

2000

1500

1000

800

600

400

200

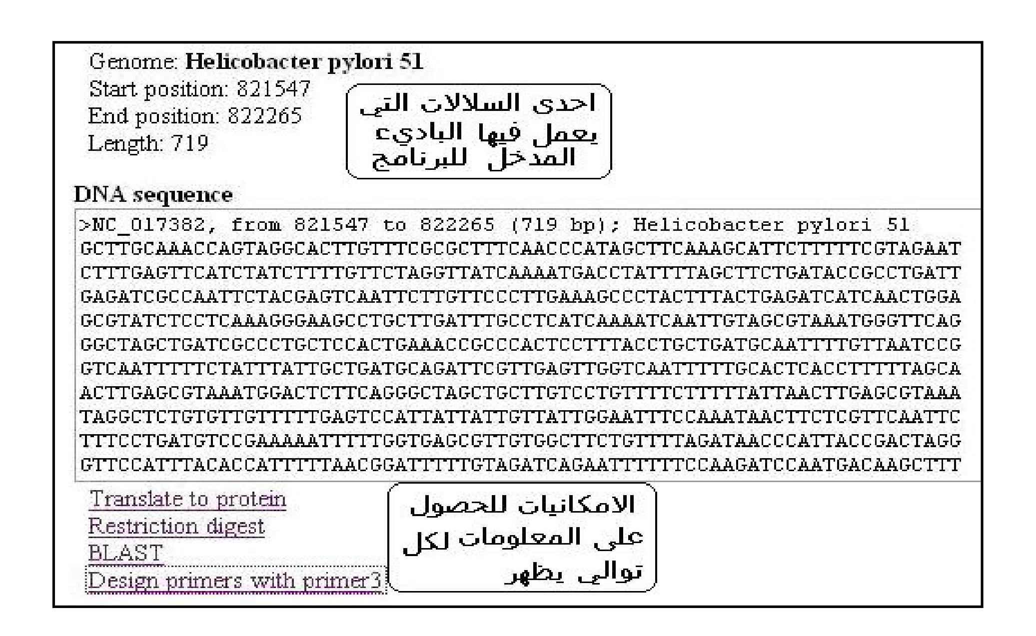
100

* بالنقر تظهر امكانيات اخرى

(1) (1) (1)

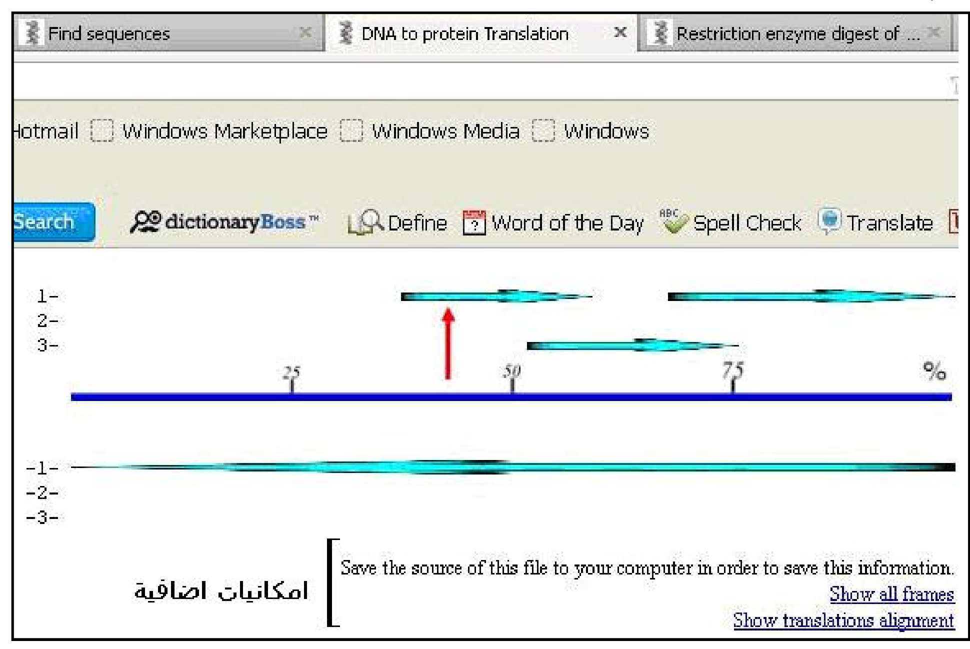
شكل 80 : نتائج فحص البواديء باستعمال *In Silico* PCR amplification

ويمكن معرفة الأنواع من استعمال الأرقام الظاهرة في واجهة النتائج . وفي الحزم القريبة او الثانوية (أسفل الشكل) يمكن ان تسترد بالنقر عليها كما في الشكل التالي الذي تظهر معه عدد من الإمكانيات المبينة في الفقرة الآتية



ومنها الترجمة الى البروتينات بمختلف الأطر . وإيجاد خارطة القطع بالإنزيمات القاطعة للتوالي المسترد وكذلك الاصطفاف ونتائجه المصورة والنصية وإمكانية تصميم البوادىء باستعمال Primer3 وهذه موضحة في الأشكال التالية على التوالي ضمن الشكل (81) .

خاصية الترجمة



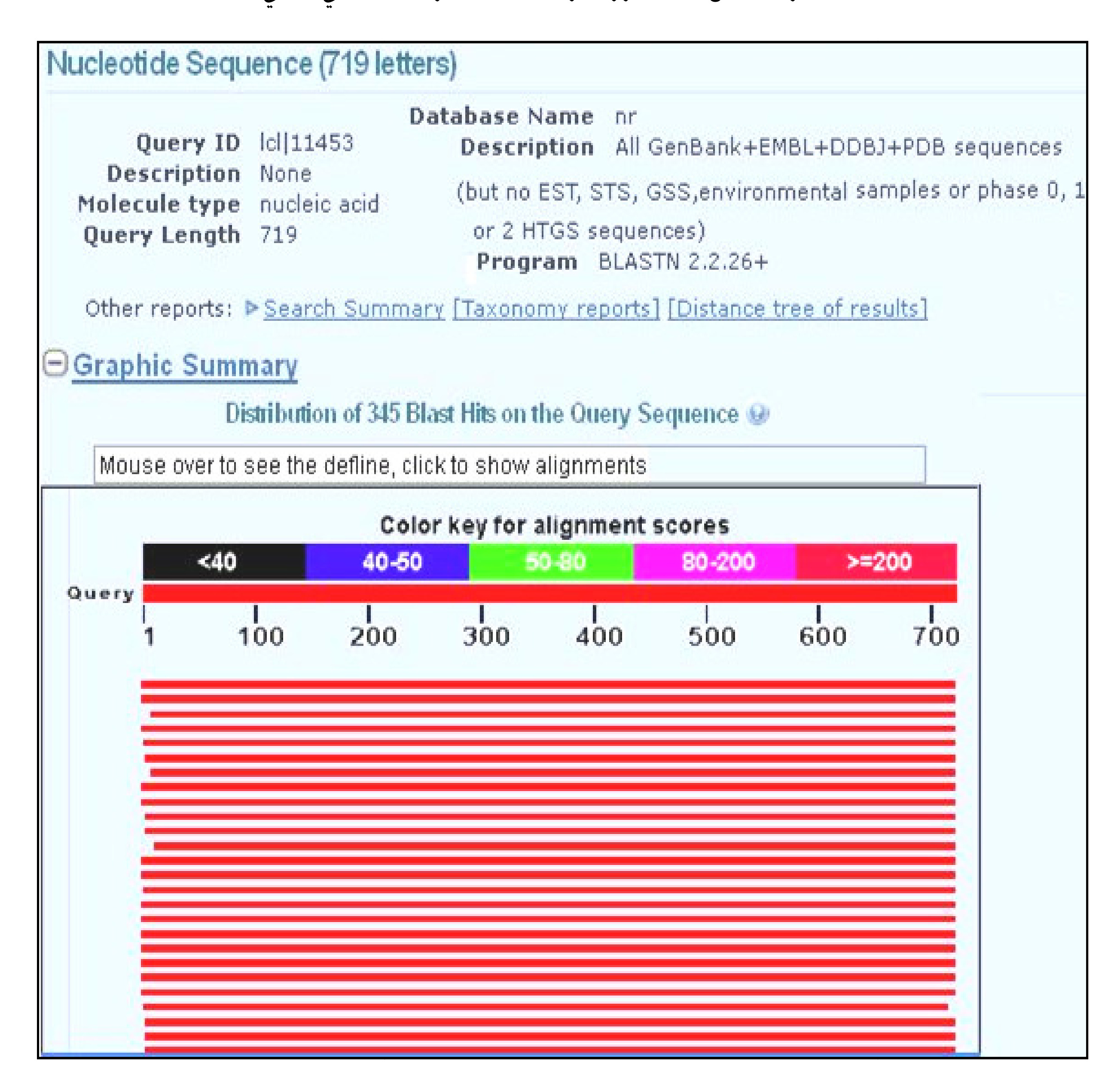
أيجاد مواقع الانفلاق بالإنزيمات القاطعة

```
Lengh of code: 719
G+C=40%

GCTTGCAAAC CAGTAGGCAC TTGTTTCGCG CTTTCAACCC ATAGCTTCAA AGCATTCTTT TTCGTAGAAT CTTTGAGTTC ATCTATCTTT TGTTCTAGGT  100
TATCAAAATG ACCTATTTTA GCTTCTGATA CCGCCTGATT GAGATCGCCA ATTCTACGAG TCAATTCTTG TTCCCTTGAA AGCCCTACTT TACTGAGATC  200
ATCAACTGGA GCGTATCTCC TCAAAGGGAA GCCTGCTTGA TTTGCCTCAT CAAAATCAAT TGTAGCGTAA ATGGGTTCAG GGCTAGCTGA TCGCCCTGCT  300
CCACTGAAAC CGCCCACTCC TTTACCTGCT GATGCAATTT TGTTAATCCG GTCAATTTTT CTATTTATTG CTGATGCAGA TTCGTTGAGT TGGTCAATTT  400
TTGCACTCAC CTTTTTAGCA ACTTGAGCGT AAATGGACTC TTCAGGGCTA GCTGCTTGTC CTGTTTTCTT TTTATTAACT TGAGCGTAAA TAGGCTCTGT  500
GTTGTTTTTG AGTCCATTAT TATTGTTATT GGAATTTCCA AATAACTTCT CGTTCAATTC TTTCCTGATG TCCGAAAAAT TTTTGGTGAG CGTTGTGGCT  600
TCTGTTTTAG ATAACCCATT ACCGACTAGG GTTCCATTTA CACCATTTTT AACGGATTTT TGTAGATCAG AATTTTTTCC AAGATCCAAT GACAAGCTTT  700
TGAGTTCGGC TAGGGCTTG
```

Restriction enzyme	Cuts	Positions
AccII,Bsh1236I,BspFNI,BstFNI,BstUI,MvnI CG^CG	1	28
AciI,BspACI,SsiI C^CG_C or G^CG_G	2	131 310
AcsI,ApoI,XapI R^AATT_Y	3	532 577 670
AluI AG^CT	5	44 121 286 451 696

اما عمليات الاصطفاف ونتائجها الصورية والنصية موضحة في الآتي :



Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
gi|261837457|CP000012.1	Helicobacter pylori 51, complete genome	1383	1563	100%	0.0	100%
gi|22335945|AB090132.1	Helicobacter pylori gene for CagA, partial cds, strain:MK M-07	1290	1372	100%	0.0	98%
gi|22335848|AB090105.1	Helicobacter pylori gene for CagA, partial cds, strain:F73	1286	1396	98%	0.0	98%
gi|317181290|AP011945.1	Helicobacter pylori F57 DNA, complete genome	1285	1428	100%	0.0	100%
gi|22335914|AB090123.1	Helicobacter pylori gene for CagA, partial cds, strain:MK F-09	1285	1410	99%	0.0	98%
gi|22335949|AB090133.1	Helicobacter pylori gene for CagA, partial cds, strain:MK M-08	1281	1363	99%	0.0	98%
gi|22335829|AB090100.1	Helicobacter pylori gene for CagA, partial cds, strain:F47	1275	1406	98%	0.0	98%
gi|52693783|AB190935.1	Helicobacter pylori cagA gene for cytotoxin associated protein A, complete	1273	1355	100%	0.0	97%
gi|22335396|AB090074.1	Helicobacter pylori gene for CagA, complete cds, strain:F15	1273	1387	100%	0.0	97%
gi|340545016|AB587252.1	Helicobacter pylori cagA gene for cytotoxin-associated protein A, complete	1269	1349	99%	0.0	97%
gi|71143459|DQ091000.1	Helicobacter pylori strain CPY2052 CagA (cagA) gene, complete cds	1263	1346	99%	0.0	97%
gi|22335813|AB090096.1	Helicobacter pylori gene for CagA, partial cds, strain:F41	1263	1394	98%	0.0	98%
gi|317176808|AP011940.1	Helicobacter pylori F16 DNA, complete genome	1261	1367	100%	0.0	100%
gi|307135446|GU173863.1	Helicobacter pylori strain PHL37 cytotoxin-associated protein A (cagA) ger	1261	1375	100%	0.0	97%
gi|188039907|EU681369.1	Helicobacter pylori cytotoxin associated protein A variant 132C (cagA) ger	1261	1344	99%	0.0	97%
gi|110292866|AB246741.1	Helicobacter pylori cagA gene for cytotoxin associated protein A, complete	1261	1381	100%	0.0	97%
gi|52693801|AB190944.1	Helicobacter pylori cagA gene for cytotoxin associated protein A, complete	1261	1349	100%	0.0	97%
gi|46091325|AB120416.1	Helicobacter pylori genes for cag pathogenicity island protein, complete cc	1261	1301	100%	0.0	97%
gi|22336011|AB090150.1	Helicobacter pylori gene for CagA, partial cds, strain:OK158	1261	1349	100%	0.0	97%
gi|22335992|AB090145.1	Helicobacter pylori gene for CagA, partial cds, strain:OK134	1261	1344	100%	0.0	100%
gi|22335420|AB090080.1	Helicobacter pylori gene for CagA, complete cds, strain:F36	1261	1387	100%	0.0	97%

ويمكن تصميم بوادىء باستعمال Primer3 من موقع *In Silico* primer amplification

```
PRIMER PICKING RESULTS FOR REQUEST kAlvyonHf736cJP

No mispriming library specified
Using 0-based sequence positions
OLIGO            start  len     tm     gc%    any    3' seq
LEFT PRIMER        129   18   59.74   55.56   4.00   2.00 ACCGCCTGATTGAGATCG
RIGHT PRIMER       322   18   60.05   55.56   3.00   0.00 AAAGGAGTGGGCGGTTTC

                                        Select pair of primers above for PCR

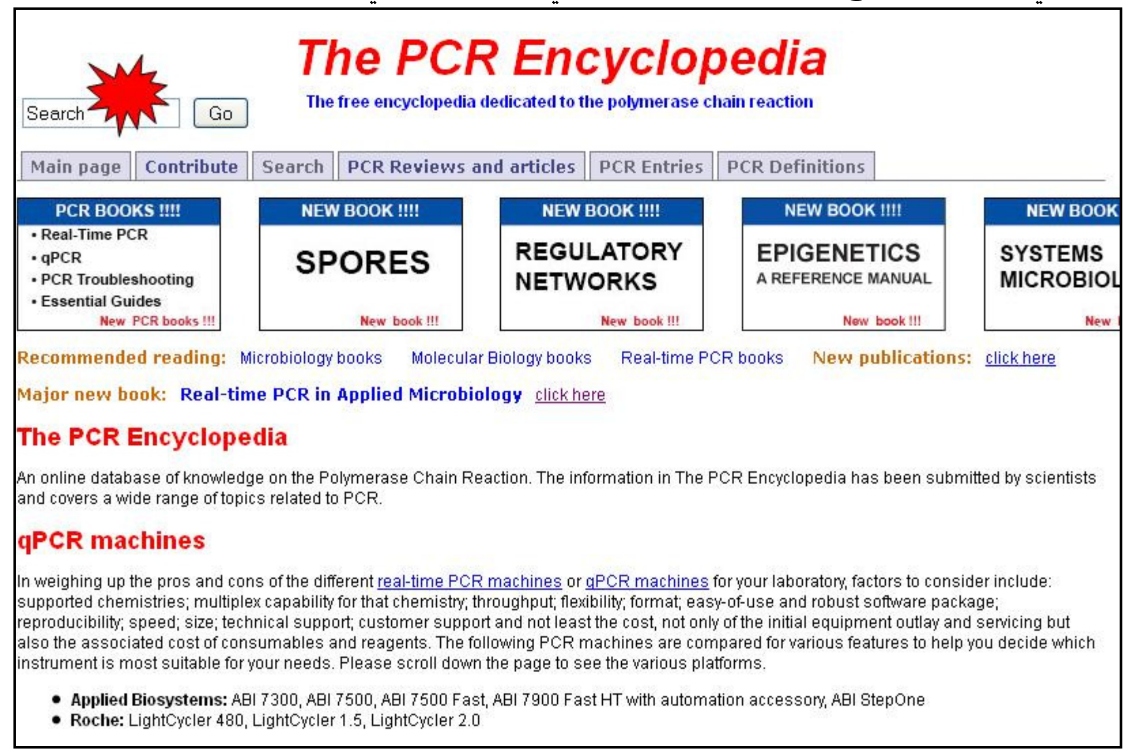
SEQUENCE SIZE: 719
INCLUDED REGION SIZE: 719

PRODUCT SIZE: 194, PAIR ANY COMPL: 6.00, PAIR 3' COMPL: 3.00
    0 GCTTGCAAACCAGTAGGCACTTGTTTCGCGCTTTCAACCCATAGCTTCAAAGCATTCTTT
   60 TTCGTAGAATCTTTGAGTTCATCTATCTTTTGTTCTAGGTTATCAAAATGACCTATTTTA
  120 GCTTCTGATACCGCCTGATTGAGATCGCCAATTCTACGAGTCAATTCTTGTTCCCTTGAA
               >>>>>>>>>>>>>>>>>>
  180 AGCCCTACTTTACTGAGATCATCAACTGGAGCGTATCTCCTCAAAGGGAAGCCTGCTTGA
  240 TTTGCCTCATCAAAATCAATTGTAGCGTAAATGGGTTCAGGGCTAGCTGATCGCCCCTGCT
  300 CCACTGAAACCGCCCACTCCTTTACCTGCTGATGCAATTTTGTTAATCCGGTCAATTTTT
          <<<<<<<<<<<<<<<<<<
```

شكل 81 : الإمكانيات في موقع *In Silico* PCR amplification

موسوعة تفاعلات الكوثرة PCR encyclopedia

فضلا عن البرامج المذكورة أعلاه انشأ موقع لموسوعة PCR التي توفر واجهتها نافذة للبحث في هذا الموضوع . واجهة الموسوعة في الشكل الآتي (شكل 82)

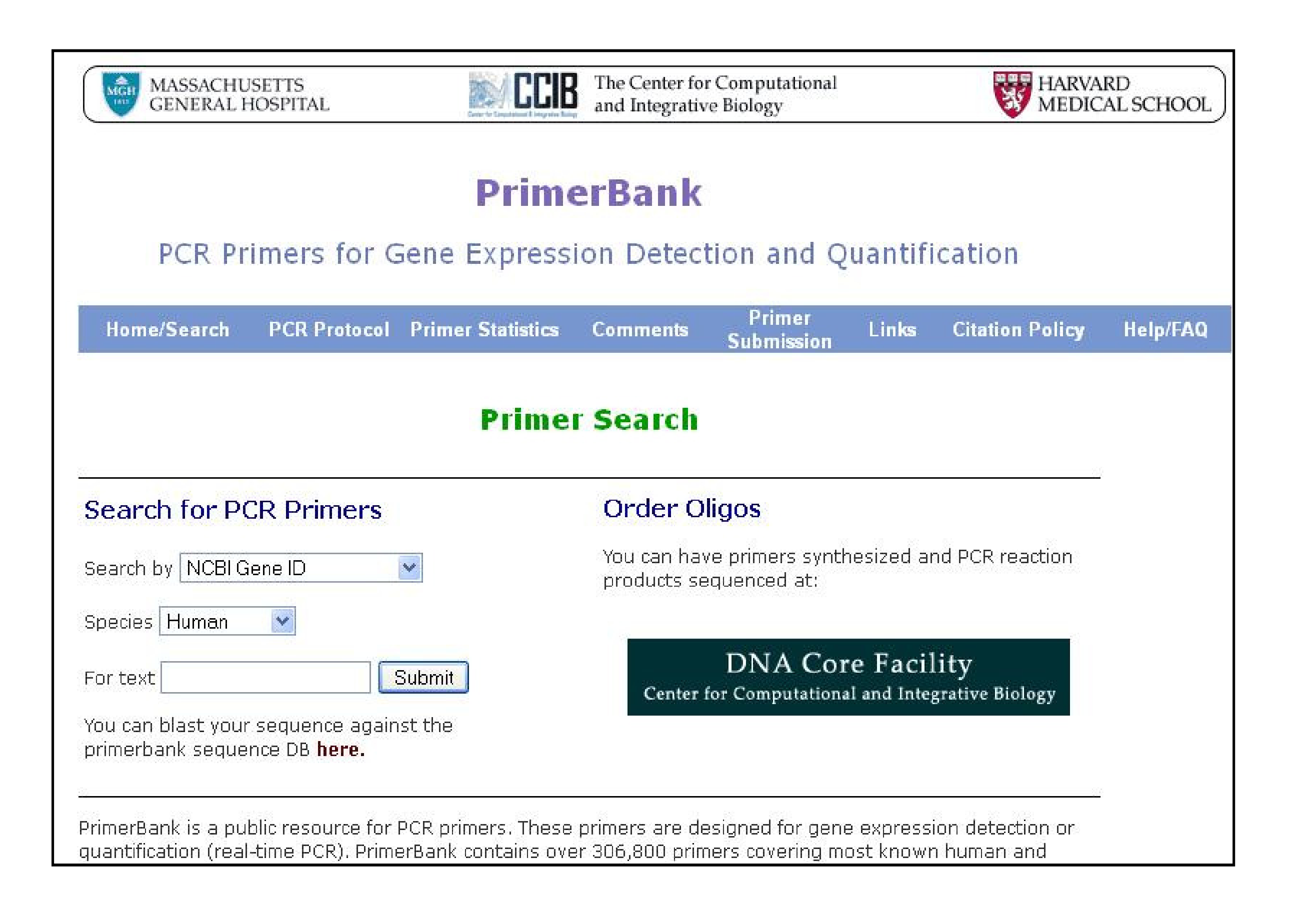


شكل 82 : واجهة موسوعة PCR

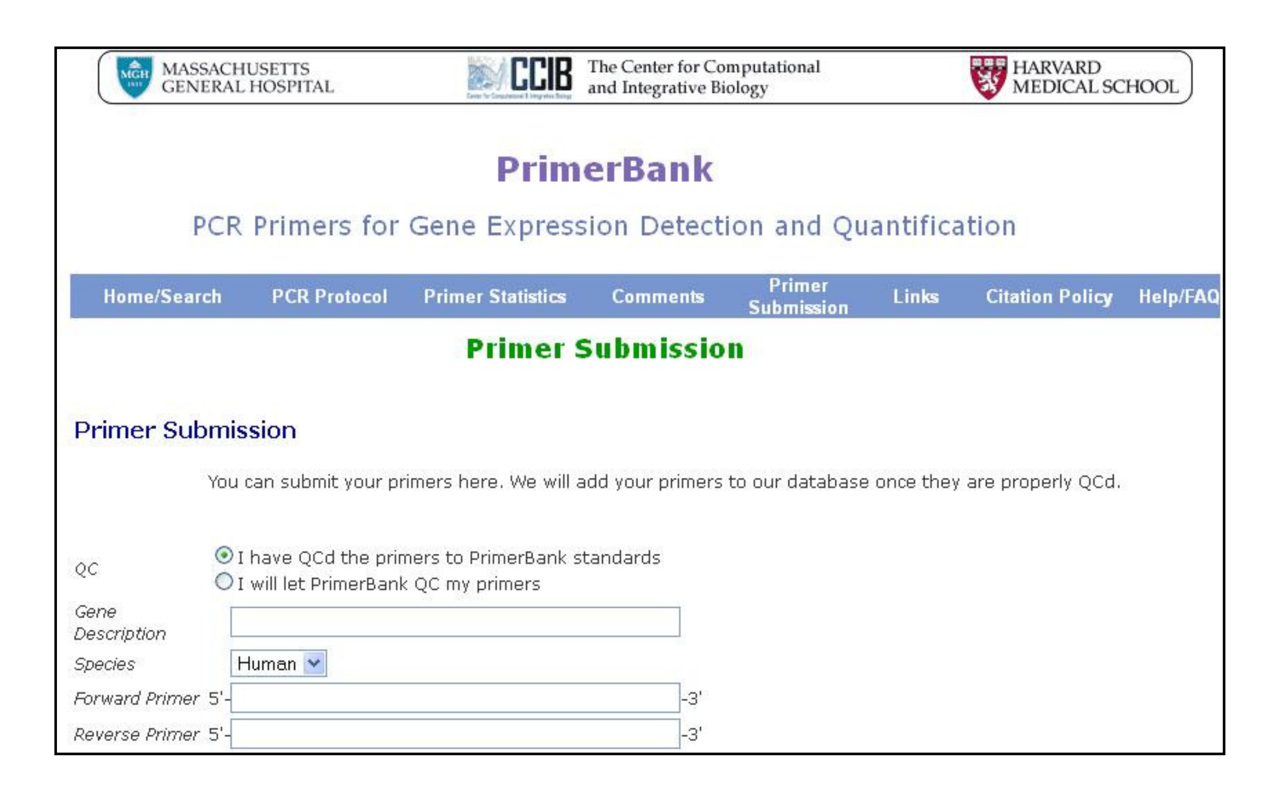
فضلا عن إنشاء موسوعات خاصة ببعض أنواع الكوثرة مثل RT-PCR وغيرها .

بنك البوادىء PrimerBank

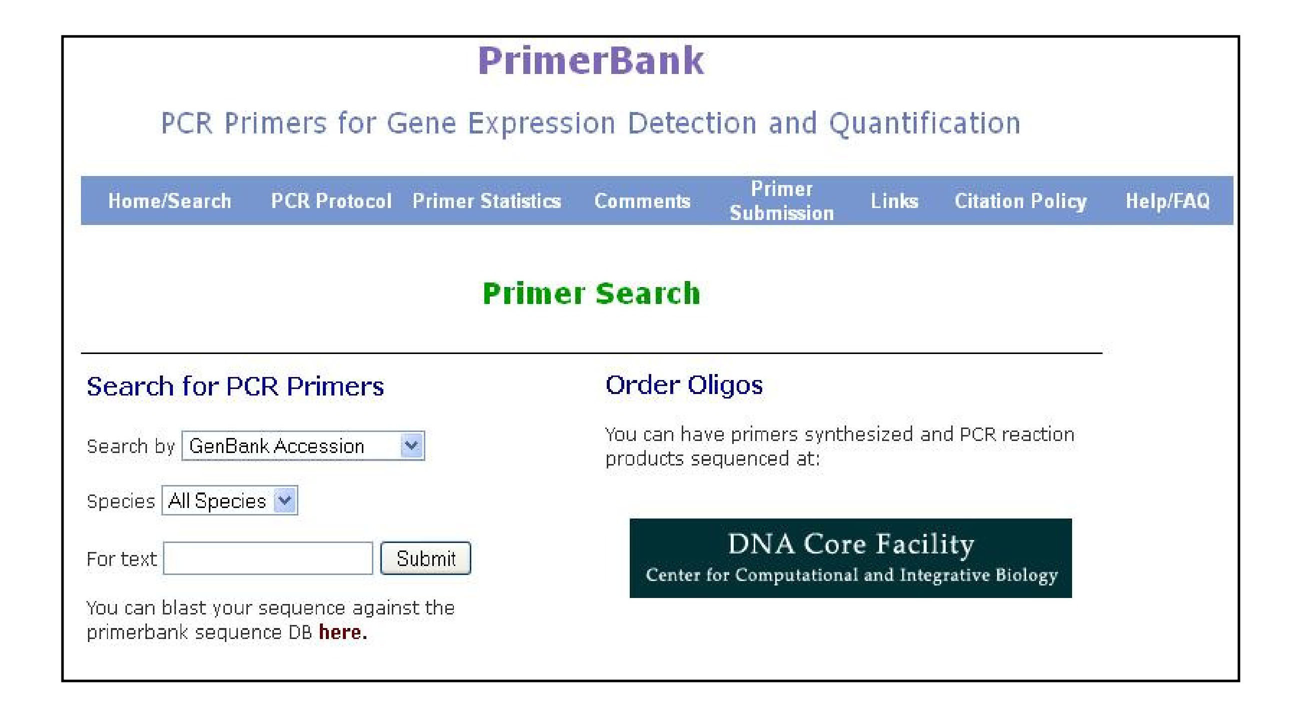
ونظرا لأهمية البوادىء وكثرتها لذلك انشأ بنك خاص بها PrimerBank (http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank) الذي يوفر إمكانيات كثيرة والواجهة العامة موضحة في الآتي (شكل 83)



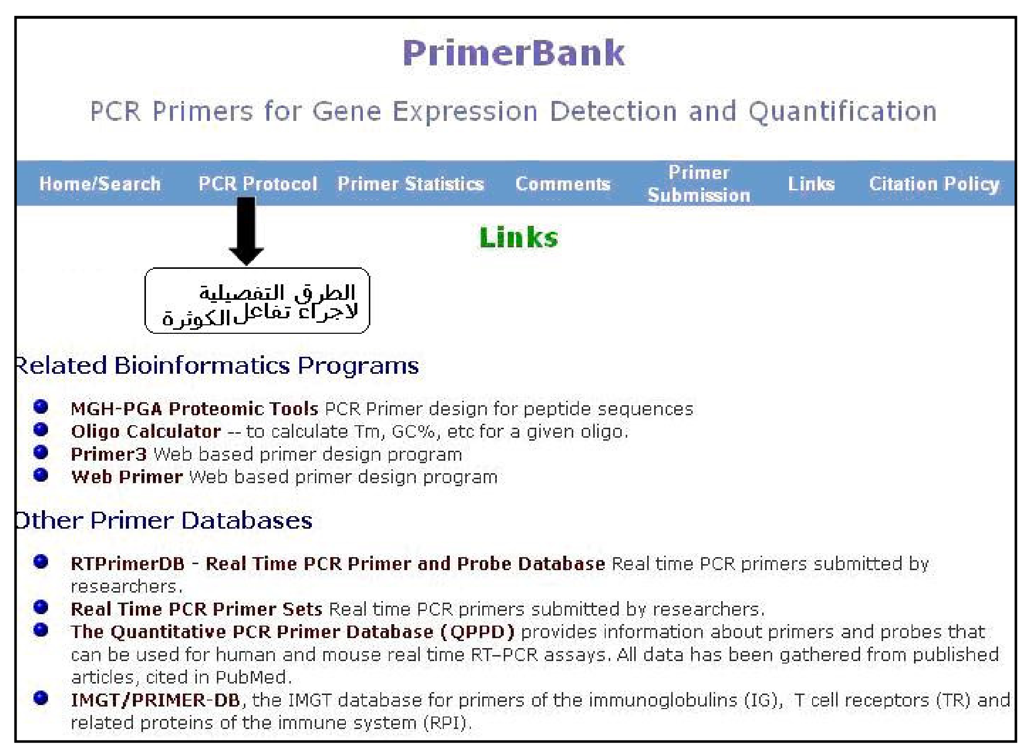
الواجهة التي يمكن بواسطتها ايداع البوادىء من قبل المستخدم



واجهة البحث عن البواديء الجاهزة مصنفة وفق أنواع الأحياء المختلفة



الروابط ذات العلاقة التي يوفرها البنك



شكل 83 : بنك البوادي وتفاصيله

يحوي البنك عددا كبيرا من البوادي المصممة لتحديد التعبير الجيني او تحديد الكميات (RT-PCR) . وفي الوقت الحاضر فالبوادي المخزونة تغطي التواليات الخاصة بالإنسان والفيران .

وهناك عدة طرق للبحث في البنك منها استعمال رقم التسجيل في قاعدة بيانات الجينات GenBank Accession No. او NCBI protein Accession No. او باستخدام NCBI gene ID او رمز الجين Gene symbol ويمكن استعمال PrimerBank ID في حالة معرفته ، وهذا يعني الارتباط الوثيق بموقع NCBI . ولكن يمكن استعمال الكلمات المفتاحية او استعمال التواليات ليتم البحث عنها في قاعدة البيانات الخاصة بالبنك

يمكن استعمال البنك لعمل الاصطفافات BLASTing للجين تحت الدراسة مع قاعدة البيانات الخاصة بالبنك . ويوفر البنك روابط الى برامج مستعملة في المعلوماتية مثل Primer3 . Webprimer او حاسبات خاصة بتفاعلات الكوثرة كما موضح في الشكل اعلاه .

ويرتبط البنك بقواعد بيانات عدة ومنها الخاصة بعلوم المناعة IMGT بما تحويه من زاخر البيانات . وإضافة الى ذلك فان البنك يوفر الطرق لإجراء التفاعلات ضمن مفردة PCR protocol وحل مشاكلها وتفاصيلها الدقيقة .

الفصل السابع	
تحليل صور هلام الفصل	
أهداف تحليل صور الهلام	
طرق قياس ومعالجة الصور وتطبيقاتها	
مشاكل الصور	
برامج تحليل الصور Image analyzing programs	
المواقع الالكترونية لبعض البرامج الخاصة بتحليل الصور	
مستقبل تفاعلات الكوثرة	

تحليل صور هلام الفصل

ان أول ترحيل كهربائي للمواد كان في عام 1807 عند ملاحظة حركة الجزيئات الغروية تحت تأثير المجال الكهربائي تحت المجهر واستغلت هذه في الترحيل الكهربائي لأغلب تفاعلات الكوثرة ، اذ ترحل النواتج تحت ظروف معينة مما يؤدي الى فصل جزيئات الحوامض النووية عن بعضها اعتمادا على أوزانها الجزيئية ، وتستعمل هذه النواتج في عدد من التحليلات مثل Western blot ، Northern blot ، Southern blot ، او تصور تحت الضوء فوق البنفسجي Ultraviolet light . وتصوير الهلام يعطي توثيق دائمي Permanent record لتجارب الترحيل الكهربائي والذي بدوره يوفر إمكانيات التعرف على حركة جزيئات DNA (أي موقع الحزم) في كل مسار وبيانات أخرى . وتهتم المعلوماتية الحيوية في هذا المجال في تحليل صور الهلام Gel analysis بشكل كبير . لذلك وضعت الخوارزميات والبرامج واستخدم فيها اكبر قدر ممكن من الإحصاء . وفي مجال تحليل الصور استخدمت طرق رياضية مثل علم الشكل الرياضي Mathematical morphology methods ضمن العلاقات الرياضية Top-Hot transform و Hit/Miss . ومن هذه العلاقات يمكن الحصول على بعض البيانات مثل الطول والمساحة وشكل المدرج الإحصائي Histogram التي تفسر الأشكال المجسمة Stereology وكذلك العلاقات الإحصائية وإمكانية تصنيف هذه البيانات لتستعمل فيما بعد في تحديد كمية المواد وهي جزيئات DNA في هذه الحالة ، وتندرج ضمنها عمليات تحليل صور المصفوفات الدقيقة Microarrays بكافة أنواعها . ومن هنا يتبين ان الحصول على الصور الواضحة يكون الأساس في العمليات اللاحقة .

وتوجد وسائل عدة لقياس الضوء المنبعث من الحزم او البقع منها مقاييس Densitometers و Document scanner التي تكون سريعة وغير مكلفة لتحليل الصور من الفلم الناتج من بقع العديد من البروتينات والحوامض النووية .

أهداف تحليل صور الهلام

هناك أهداف عدة من تحليل الصور منها الحصول على معلومات كمية ونوعية ، وقد برز التحليل الرقمي ليكون الأهم في التطبيقات بالاعتماد على الحاسوب لتقليل الخطأ البشري وزيادة سرعة تقييم النتائج ، ويمكن قياس التشابه والعلاقات بين الجزيئات في

المسارات المختلفة من صور الهلام ، ففي الحالة الطبيعية لدراسة المجتمعات يكون هنالك عنقدة Clustering وتجميع للبيانات التي يتم الحصول عليها اعتمادا على التشابه اي محاولة إيجاد التجمع الطبيعي Natural grouping لمجموعة من البيانات أي قياس المسافات ووضع مصفوفات لها . و هذه العنقدة تعتمد على أساسين :

- كيفية قياس التشابه بين النماذج .
- كيفية فصل النماذج الى عناقيد او مجاميع من بين عدد كبير من المدخلات مثل الحزم او البقع الناتجة من الترحيل ببُعدين (Two Dimensional)على هلام الترحيل .

واستخلاص المعلومات النوعية والكمية من الصور تمثل أهداف أساسية من تحليل الصور . وتحليل الصور ذات الاتجاه الواحد (1D) وهو الغرض الذي يتناوله الكتاب ، تعنى بوجود ثلاث قياسات هي العرض والسمك والكثافة الضوئية OD . اما في حالة الترحيل ثنائي الاتجاه (2D) فهناك مؤشرات إضافية مثل الانضغاط Compactness ، والاستطالة والانحناء والمحور الأساسي وغيرها .

ومن أهم معالم التشابه والاختلاف بين نموذجين هو قياس المسافة . لذلك في البداية لابد من تحديد دالة المسافة ثم وضع مصفوفة مثل الأزواج في النماذج .

وتستعمل برامج عدة طرق للعنقدة باعتماد قياس المسافات ومنها طرق تعتمد على الشبكات العصبية Statistical clustering او خوارزميات العنقدة الإحصائية Statistical clustering algorithms . وتدمج هذه مع وسائل أخرى في بعض البرامج لأهداف كثيرة منها تحسين الصور ، وإيجاد الكميات في الحزمة الواحدة وإيجاد الوزن الجزيئي للمواد من الحزمة بعد تعريف أوزان حزم سلم الواسمات Ladder markers ، وبرامج أخرى توفر إمكانية وجود العلاقات التطورية Phylogenetic relationships فيما اذا كانت الحزم مشتقة من كائن واحد او كائنات قريبة من بعضها وبطرق مختلفة كما سيأتي ذكره لاحقا .

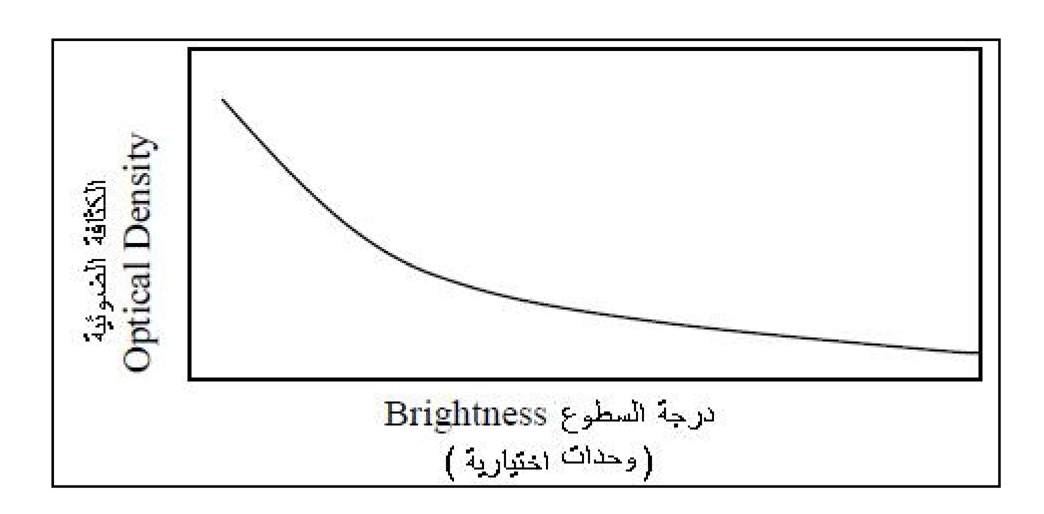
طرق قياس ومعالجة الصور وتطبيقاتها

هناك أكثر من طريقة لإجراء القياسات ومعالجة الصور ، وكما ذكر أعلاه فان التحليل الرقمي Digital analysis برز ليكون أهم الوسائل للتحليل ، وفي هذه الحالة تحول المعلومات الموجودة في صورة الهلام الى صيغ رقمية او رسوم او جداول ويمكن ان يكون ضمن النظام الثنائي (Binary أي 0 او 1 ، او استعمال + او –) تساعد في تحليل الصور الذي يكون صعبا بالنسبة للإنسان ، ويمثل هذه التقنيات يمكن ان تستعمل الصور في :

- الدراسات التصنيفية وإيجاد العلاقات التطورية بين الأحياء .
- دراسة الوبائية في حالة الأمراض .
- دراسة وراثة العشائر .

فالتحليل الرقمي يهدف الى إيجاد مواقع الحزم والطول والمساحة والشكل فضلا عن إظهار التحليل الإحصائي لها ، ويكون ذلك باعتماد التحولات Histogram transformations واستعمال أنظمة التصفية مثل Linear filtering او Non-linear filtering وكذلك تحديد القيم الفاصلة Thersholding لتغيير وتحسين الصور الخام للهلام .

واهم الطرق لقياس التركيز هو استعمال الكثافة الضوئية التي تقيس التركيز في الحزمة وتكون دالة لوغارتمية لدرجة السطوع كما موضح في الشكل الآتي (84) :



شكل 84 : علاقة درجة سطوع الصور بالكثافة الضوئية

وكذلك يمكن استعمال مقاييس الكثافة Densitometers لقياس التركيز في بقع الحوامض النووية والبروتينات .

وفي الوقت الحاضر تستعمل وسائل دراسة الشكل الرياضية وعلم المجسمات Stereology في إيجاد التوزيع وتحديد الحجم .

ومن الطرق الأخرى هو استعمال مجال التردد Frequency space ويعتمد هذا التوجه على الاختلاف في الإشارات . فالخلفية تعطي إشارات تردد واطئة والتي يمكن ان تفصل عن الترددات العالية الخاصة بالنماذج ويكون هذا باستعمال مرشحات خاصة (High – pass filter) او استعمال التصفية غير الخطية Non-linear filtering وهي التي تستعمل للمشاكل التي لا تحل باستعمال المرشحات المباشرة او الخطية Linear filters .

وفي معظم الطرق أعلاه لابد من استعمال سيطرات للقياس وهي حزم مرجعية Reference bands ، والمعروف ان الحزم ذات الوزن الجزيئي المتماثل تكون لها في العادة حركة متماثلة Electrophoretic mobility ، وهذه تقارن مع منحنيات تعيير محضرة مسبقا من حزم او بقع قياسية ذات قيم معروفة او من إجراء المقارنة من نتائج التجارب السابقة للنموذج نفسه باستعمال تخافيف متتالية .

وعلى العموم عند تحديد الكميات من شكل وحجم الحزم يتم تقسيم الصورة الى نموذج مقابل الخلفية (Object vs background) والتي تخضع لوجود حد فاصل ، ثم تجرى عليها القياسات .

مشاكل الصور

بداية يلاحظ ان اغلب البرامج التي تعنى بتحليل الصور تحولها الى نظام الأبيض والأسود Gray scale وفي الكثير من الأحيان لا تكون الصور واضحة المعالم جدا او تكون الحزم مشوهة نتيجة لظروف التجربة الرديئة عند أي مرحلة من المراحل ولذلك يكون هناك تشوه شكلي Geometric distortions ، ويطلق على التشوه الأفقي للحزم في المسار (Lane) الابتسامات Smiles ، او تكون السطوح غير متجانسة ، فضلاً عن وجود الكواذب الاصطناعية والخلفية المشوشة ، وكل هذه تمثل مشاكل في تحليل الصور والاهم من كل هذه المشاكل هو وجود الخلفية المشوشة ، ونظرا للاختلافات وأنواع المشاكل الكبيرة فلا توجد طريقة او خوارزمية واحدة لتحديد الحزم .
و لكن الاتجاه العام لتحسين الصور يتمثل بوضع قيم فاصلة Threshold للقيم المقاسة (مثل الكثافة الضوئية) او غيرها من المؤشرات ، واستعمال نظام التصفية Filtering لتحسين الصور الخام (Raw images) ، والعديد من البرامج مزودة بآليات للتعديل من قبل المستخدم ، ومنها صيغة الصور التي تكون مختلفة مثل

PNG(Portable Networks Graphics)

GIF(Graphic Interchange Format)

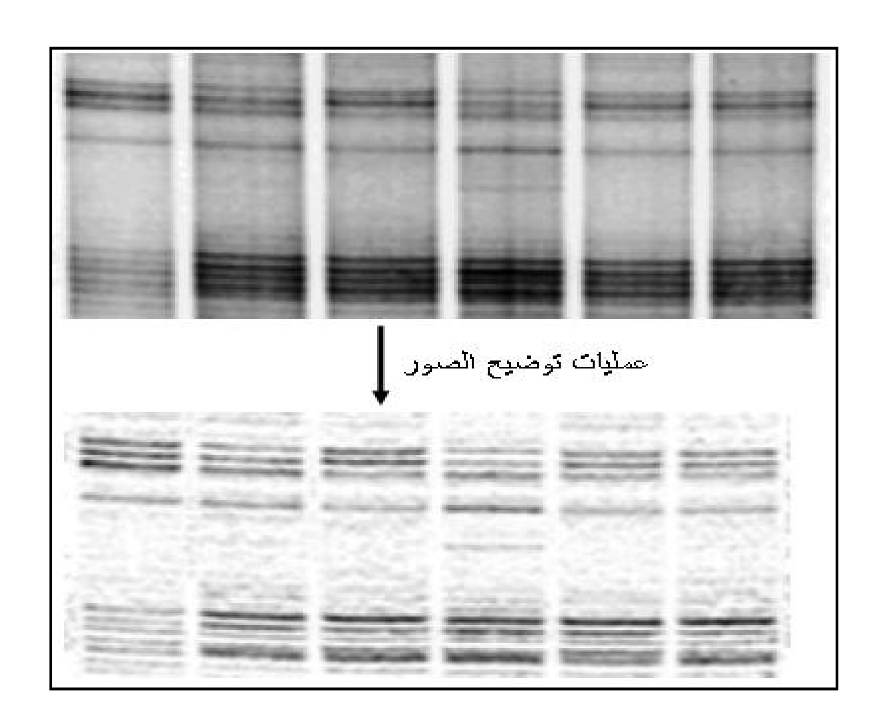
JPEG file Interchange format (Joint Photographic Experts Group)

TIFF (Tag Image File Format)

Bitmap : Device Independent Bitmap

ويمكن استبدال الصيغة للوصول الى أفضل صورة لتحليلها . وهذا يعني ان الحصول على صورة واضحة هو الأساس في تحليل الصور وهي التي توفر إمكانيات الحصول على أفضل وضوح Optimal resolution للقياس او الحصول على الكثافة الضوئية Optical density والتي تمثل دالة لوغارتمية لسطوع ووضوح الصورة كما موضح في الشكل أعلاه

وتستعمل عدة وسائل لقياس OD مثل الكاميرات التي تتحسس لتألق الحزم في الهلام ، ووسائل أخرى تكون خاصة بالحزم التي فيها مواد مشعة والتي بدورها اي OD تستعمل في تحديد التركيز في الحزم ومثل هذا السطوع يمكن الحصول عليه من استعمال أنظمة التصفية لإزالة الخلفية والمناطق غير المرغوب فيها كما موضح في الشكل85 .

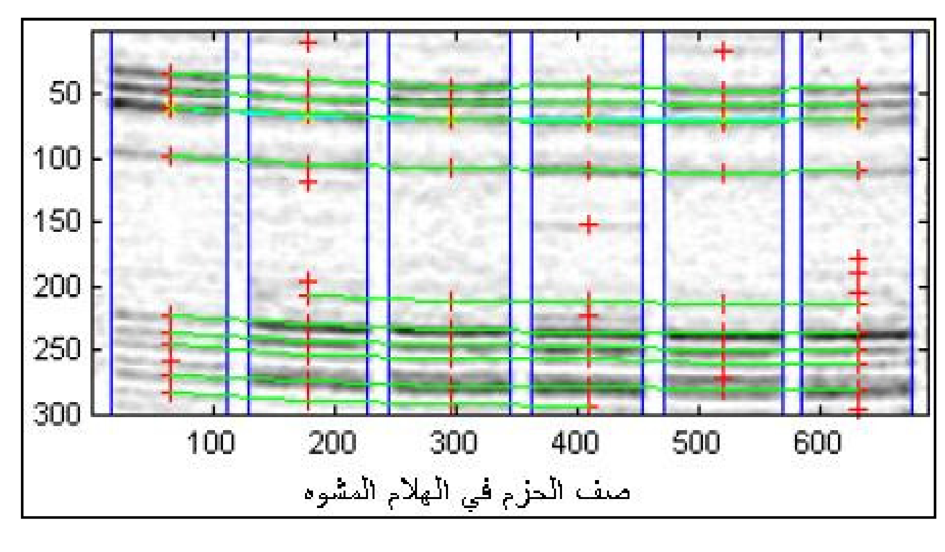


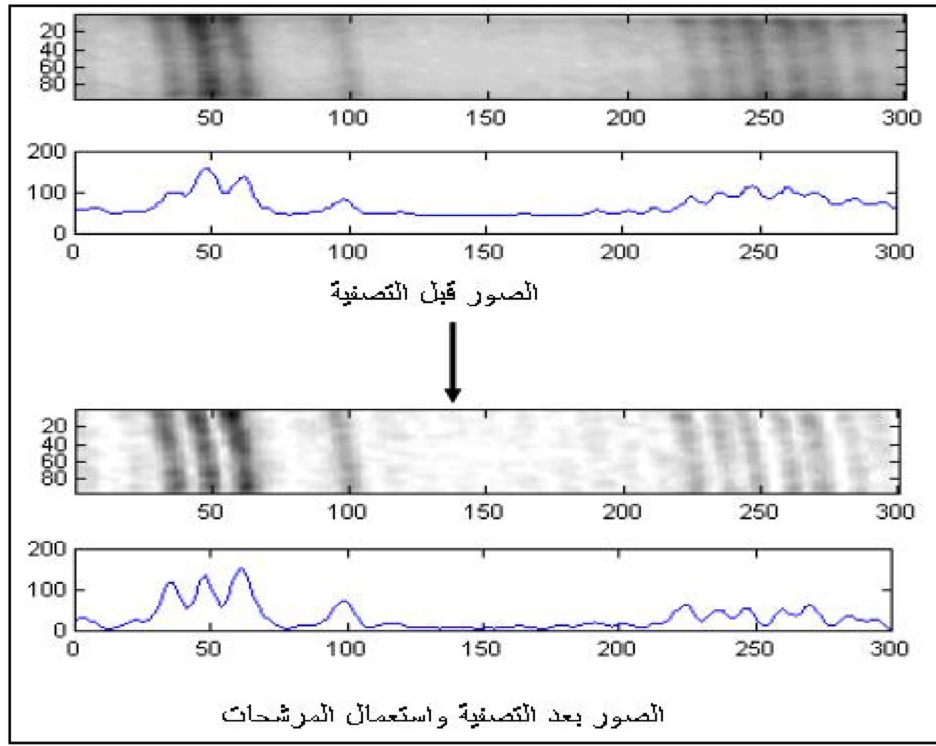
شكل 85 : معالجة الصور لغرض توضيحها

وبذا يمكن إزالة الخلفية الضبابية وكذلك تشوهات إطار الصورة ككل التي تنتج من الظروف التجريبية أثناء الترحيل او التقاط الصور .

ولتسهيل مهمة تحديد الحزم والكميات الموجودة فيها حتى من الصور المشوهة او عندما يحوي الهلام حزم غير مصطفة بشكل أفقي جيد مثل وجود الابتسامات (Smiles) . وتحوي بعض البرامج على وسائل لمحاولة التخلص من هذه المشكلة كما موضح في الشكل 78 وهذه تكون باستعمال خوارزميات تعتمد على الزوايا لكل حزمة وبمعادلات

خاصة يمكن جلب الحزمة لتصطف على المحور السيني (X- axis) والتي تنتج عنها تحسين في حساب الكميات كما موضح في الشكل 86 .





شكل 86 : عمليات التصفية والتشكيل لتوضيح الصور المشوهة

ان هذه المشاكل لا تعود الى ظروف التجربة فقط ولكنها قد تكون ناجمة من عدم اخذ الصورة تحت ظروف فيزيائية جيدة (مثل الإضاءة والمسافة اللازمتين) لذلك وجب إعادتها وعند عدم إمكانية الإعادة لابد من استعمال التصفية او اي وسيلة أخرى لزيادة الوضوح أثناء التصوير مثل استعمال وسائل لتحوير التردد High- pass filter او استعمال Nonlinear filter مرشح غير خطي للمشاكل التي لا تحل بالمرشحات الخطية Linear filters وإدخالها في حسابات رياضية للحصول على صور أوضح كما هو موضح في الشكل أعلاه .
والسبب في إجراء التعديلات أعلاه هو الابتعاد عن الانحياز الذي يمكن ان يأتي من العين البشرية لعمليات الصف وهذه تكون مؤشرات نوعية ، و لكن عمليات التحليل تحتاج الى قياسات رقمية لتوضيح الاختلافات الدقيقة .

إرشادات عامة لتحسين الصور

أي كانت الأسباب في عدم الحصول على صور واضحة فلابد من تحسينها قبل الشروع في عمليات التحليل . فمثل الابتسامات يجب ان تعدل في المسار الواحد وهذا يساعد في تقدير الكميات حتى من الصور المشوهة وتوجد برامج خاصة تساعد في ذلك .
اما الخلفية والتي تكون متفاوتة من منطقة الى أخرى وتؤدي الى صعوبة إجراء القياسات على صور الهلام يجب ان تطرح . ويجب تذكر ان بعض الحزم يمكن ان تحتفظ بدرجة من التشوه بدرجات متفاوتة حتى بعد التحسين والبعض منها يؤدي الى استحالة تحليل الصور . ولكن كإرشادات عامة يمكن إدراج بعض المعالجات منها :

- اذا كانت الخلفية المشوشة آتية من عمليات التصوير مثل استعمال إضاءة رديئة او موقع غير الجيد للتصوير فعندها ان تعالج بإعادة التصوير ، اما اذا كانت من الاستعمال الخاطئ للمواد المشعة فعندها يمكن استعمال مرشحات خاصة للحصول على الصورة الأصلية وذلك بانتخاب عدة نقاط للحصول على اقرب الحالات Least-square fitting للدالة التي تكون الأقرب للخلفية .
- في حالة RT-PCR فان وجود مزدوجات البوادىء يمكن ان يزيد من الخلفية التي يسجلها الجهاز وإنتاج قيم Ct (المذكورة في موقع آخر) اقل من 40 للنماذج ، ولتعديل هذه الحالة يتم الاهتمام وتعديل تراكيز البوادىء وفق جداول تزود من قبل الشركات المصنعة بحيث لا تعطي مزدوجات ولكن تعطي تضخيم كفء .
- يمكن تغيير رقائق الكاميرا الحساسة .

- التلاعب بدرجة السطوع Brightness والتباين Contrast وسرعة الغالق Shutter speed ، وغيرها من الإمكانيات الموجودة في الكاميرا .
- استعمال الوسائل المعتمدة على أشعة الليزر Laser scanning gel imager لانه يعطي نتائج أفضل .
- للتخلص من الحزم الباهتة التي تظهر في الصور يمكن ان تضيق الحفر التي توضع فيها النماذج عند إجراء تفاعلات الكوثرة .
- استعمال أملاح الفضة للتصبيغ لأنها أكثر حساسية .
- استعمال هلام الاكريلاميد PAGE gel لانه أكثر حساسية من الاكاروز .
- استعمال هلام رقيق لانه يعطي صور أوضح من الهلام السميك .

المؤشرات المقاسة من الصور

هناك بعض المؤشرات التي يمكن للبرامج تحديدها من الصور المختلفة الصيغ وهي على سبيل المثال لا الحصر TIFF، JPEG ويمكن استعمال اي صيغة بحيث تعطي الوضوح الأفضل وتحليل الصور والقياسات الخاصة بتفاعلات الكوثرة تقع ضمن الترحيل الأحادي البعد (One dimensional) وهذا يعني ان القياسات تشمل الطول وعرض الحزمة وسمك الحزمة والكثافة الضوئية لها ومثل هذه المؤشرات تتعقد أكثر عند استعمال الترحيل ثنائي البعد (Two dimensional) والذي يستعمل عادة مع البروتينات وهو بعيد عن توجه هذا الكتاب .

ومن الجدير بالذكر ان استعمال الطرق الرياضية ودراسة الشكل المجسم (المارة الذكر) مكنت من دراسة توزيع الحجم وتحديد حجم الهدف من تدرجات اللون المستعمل وهو Gray level information لذلك فاغلب البرامج تغير الصورة الى الأبيض والأسود Gray scale وهي شائعة في اغلب البرامج كما ذكر آنفا .

ومن المؤشرات التي يمكن قياسها :

تحديد الكميات : وفيها يتم اختيار برنامج ملائم لتحليل الصور لأنه توجد برامج تجارية كثيرة خاصة بشركات التصوير لا تلاؤم النواحي العلمية . ويكون تحديد الكميات معتمدا على الرجوع الى حزم محددة مسبقا Predefined reference band وتقسم الصورة الى قطع او (Objects) مقابل الخلفية لتطبق عليها المعادلات الرياضية وتتم بالاستعانة بمنحنى تعيير (Standard curve) كما ذكر آنفا ، ويفضل الابتعاد عن قياس

شدة الإضاءة Intensity لان معظم الصور غير ملائمة لقياس شدة الإضاءة والأفضل استعمال معاملة سيطرة تعتمد على تخافيف من النموذج نفسه إضافة الى استعمال سلم الواسمات الوزنية .

تحديد مسارات ومسافات الترحيل

من المعروف ان المسافة التي تتحركها جزيئات الحوامض النووية تعتمد على حجمها (الوزن الجزيئي) حيث ان نسبة الكتلة الى الشحنة فيها ثابتة فلا يؤثر عامل الشحنة في هذه الحالة ، ويتم تحديد ذلك عن طريق المقارنة مع سلم الواسمات المستعمل . لذلك يجب التقاط الصور بوجود مسطرة لقياس المسافة (شكل 15). ويتم قياس المسافة من الحفرة الى الحد الذي وصلته الصبغة المستعملة مع النموذج (Loading dye) لتمثل المسافة الكلية لان الصبغة تسير أسرع من اي حزمة من حزم DNA . ثم تقاس المسافة من الحفرة الى وسط الحزمة سواء للنموذج او سلم الواسمات الوزنية وبذا تكون المسافة النسبية (Relative flow (Rf التي تحركتها الحزمة محددة بالمعادلة :-

المسافة النسبية للحزمة = مسافة تحرك الحزمة / مسافة تحرك الصبغة

فلو كانت مسافة تحرك الصبغة 8 وحدات طول ، والحزمة الأولى تحركت 6 وحدات طول ، والحزمة الثانية تحركت 4.5 وحدة طول ، والحزمة الثالثة 3.5 وحدة طول فان الحركة النسبية للحزم ستكون :-

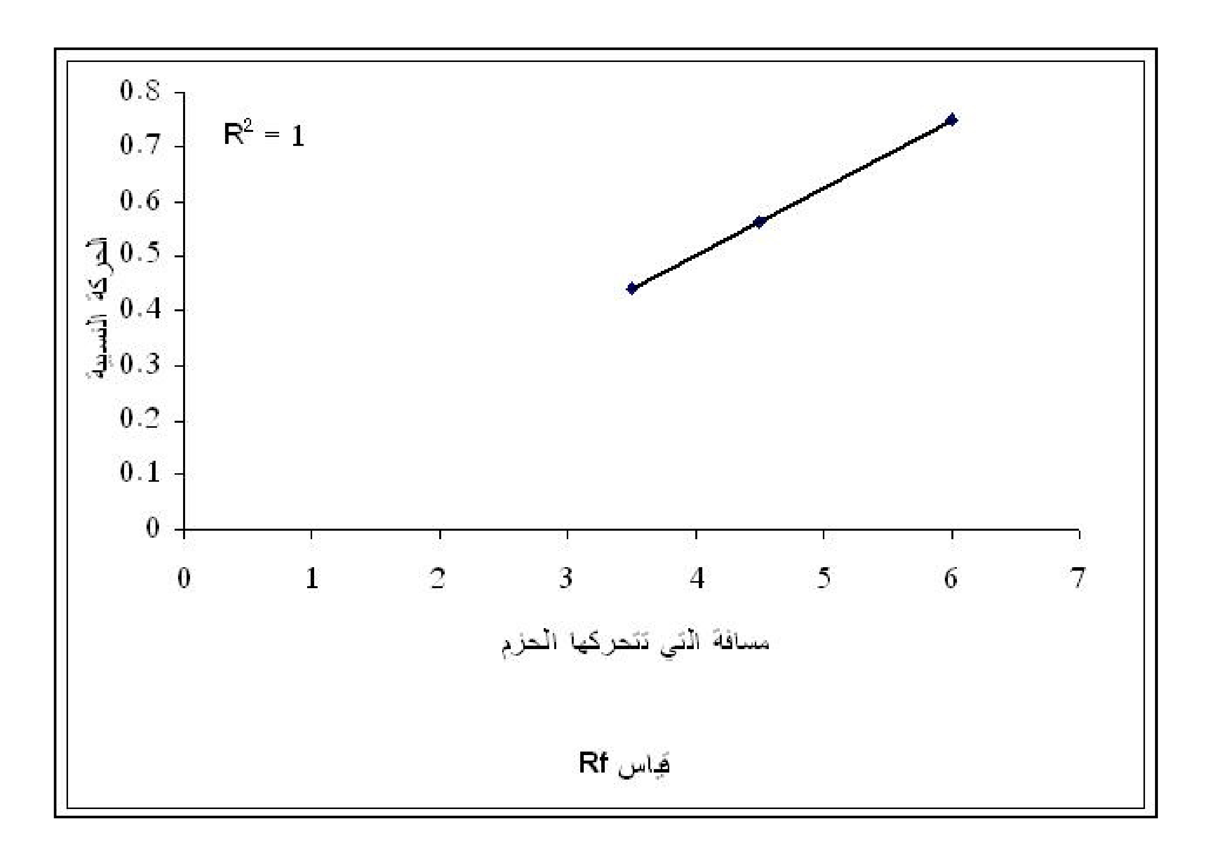
الحزمة الأولى = 0.75

الحزمة الثانية = 0.563

الحزمة الثالثة = 0.438

و باستعمال مسافة الحركة مقابل الحجم بالكيلوقاعدة (المزودة بسلم الواسمات من قبل الشركة) ورسمها ببرنامج Excel ، لتكون المسافة على المحور السيني X-axis والحجم على المحور الصادي Y-axis وباستعمال دالة Trendline function لرسم الخط الملائم واستخراج المعادلة :-

وعند صحة المعلومات تكون قيم R (الخاصة بدالة Trend line) على الأقل 0.9 كما موضح في المخطط الآتي (شكل 87) :



شكل 87 : حساب Rf

ومنها يمكن حساب حجم الحزم ، ومن الطبيعي ان تكون الحزم الصغيرة قريبة الى صبغة الأثر .
من جهة ثانية فان المسافات المسجلة تعتمد على التوزيع الجزيئي (الطبوغرافي) للجزيئات المرحلة ، وهذا يؤدي الى خلاف قواعد الحسابات المذكورة أعلاه فمثلا ، البلازميد الحلقي يتحرك أسرع من نظيره المفتوح ، والبلازميد المثلوم يتحرك مسافة اقل من نظيره المفتوح ، وبذلك فان مثل هذه الجزيئات لا يمكن تحديد حجمها على الهلام .
كما يجب الانتباه عند تحديد المسافات ، فاذا كانت هناك حزم فاتحة عند قاعدة كل مسار فهذا يعني ان النموذج يحوي RNA وان نتائج طريقة الحساب يكون مشكوك فيها وان تفاعل الكوثرة الأصلي فيه بعض الأخطاء وبالتالي تكون الصور غير ملائمة للتحليل .

برامج تحليل الصور Image analyzing programs

تختلف البرامج المستعملة لتحليل صور الهلام بشكل كبير في نواحي مختلفة منها:-

- صيغ الصور التي تحللها.
- الهدف من التحليل مثل تحديد الوزن الجزيئي او الكثافة الضوئية .
- تحديد العلاقات بين الحزم بغض النظر عن أصولها .

- تحديد شجرة العلاقات التطورية بين الأحياء تحت شروط خاصة .
- نوعية المخرجات التي تنتجها ، فقد تكون مصورة او نصية او غيرها من الصيغ .
- التوجه المستعمل ، البعض منها يكون أساسه معتمد على برنامج Excel وهذه تميل الى تضخيم القيم الإحصائية .
- توفر البرامج ، البعض منها يكون متوفرا للدراسات الأكاديمية مجانا او للتجربة لغرض شراؤه والبعض الآخر يكون مقابل ثمن .

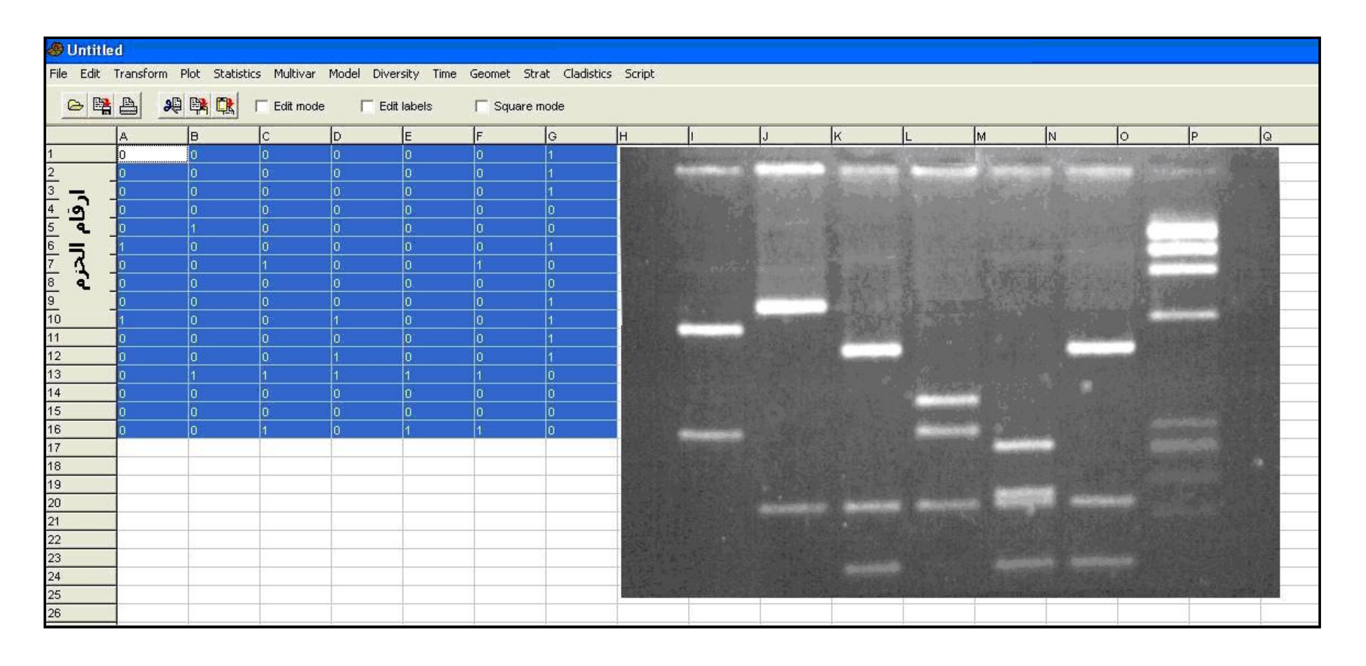
وبطبيعة الحال تختلف البرامج في طرق استعمالها والبيانات اللازمة وصيغها وكل ذلك يمكن الحصول عليه اما من نافذة Help المرفقة بالبرنامج او من الملفات المعدة لتعليم المستخدم كيفية الاستعمال User manual او إرشادات استعمال البرنامج Guide او من البحوث المنشورة حول تأسيس البرنامج ، وغيرها من الموارد .

ونظرا لكثرة البرامج سيتم تناول البعض منها :

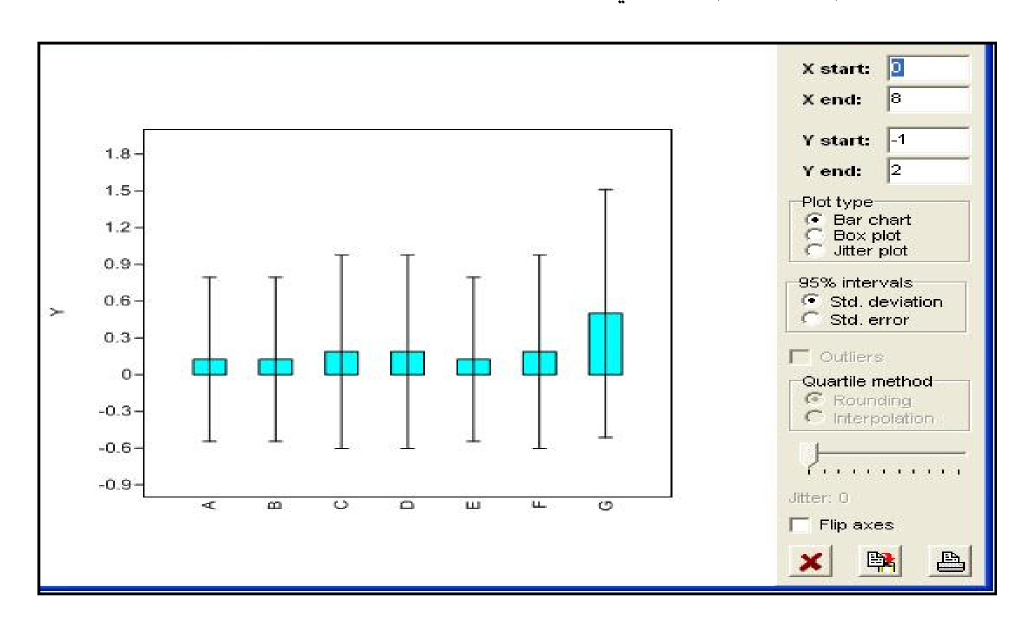
أولا : البرامج المعتمدة على Excel

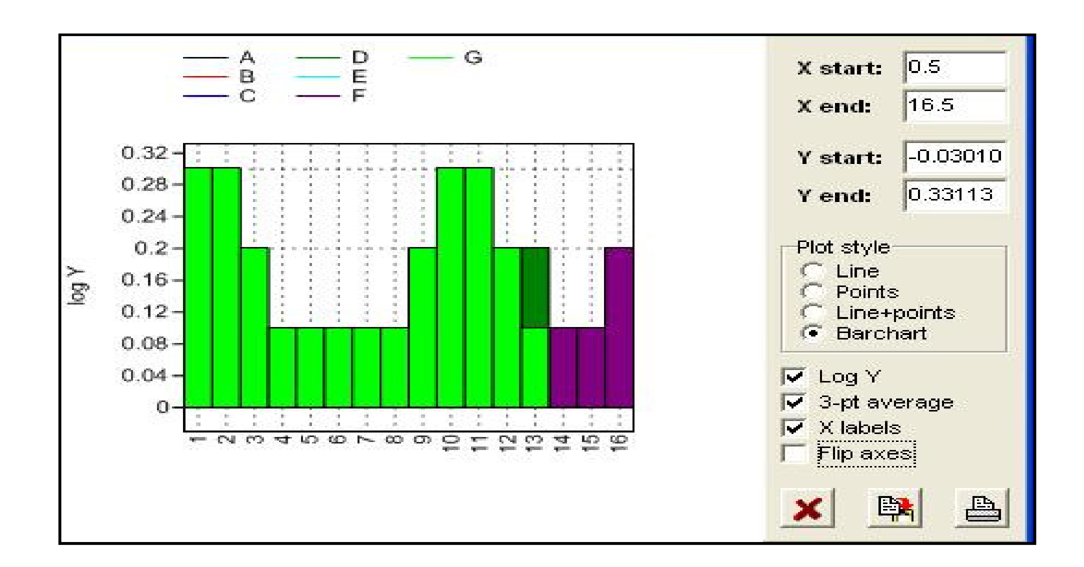
هذه النوعية من البرامج تكون مهمة للنواحي الإحصائية ويذكر منها :-

برنامج Past : هو برنامج لتحليل صور الهلام ويعتمد على النظام الثنائي اي (1.0) فعند وجود حزمة يقيمها برقم (1) ، وعند غياب الحزمة يقيمها برقم (0) ويستعمل البرنامج لتوضيح علاقة الحزم في الصورة المرافقة وتسجيل الحزم كما هو موضح في الشكل (88) وتوضح الأشكال الأخرى حجم الحزمة المحسوبة والانحراف المعياري Standard deviation وطرق أخرى لإيضاح العلاقات . ويوضح الشكل العلاقة بطريقة العنقدة Clustering method بين الحزم ، والعلاقة باستعمال طريقة ربط الجوار Neighbor joining (NJ)

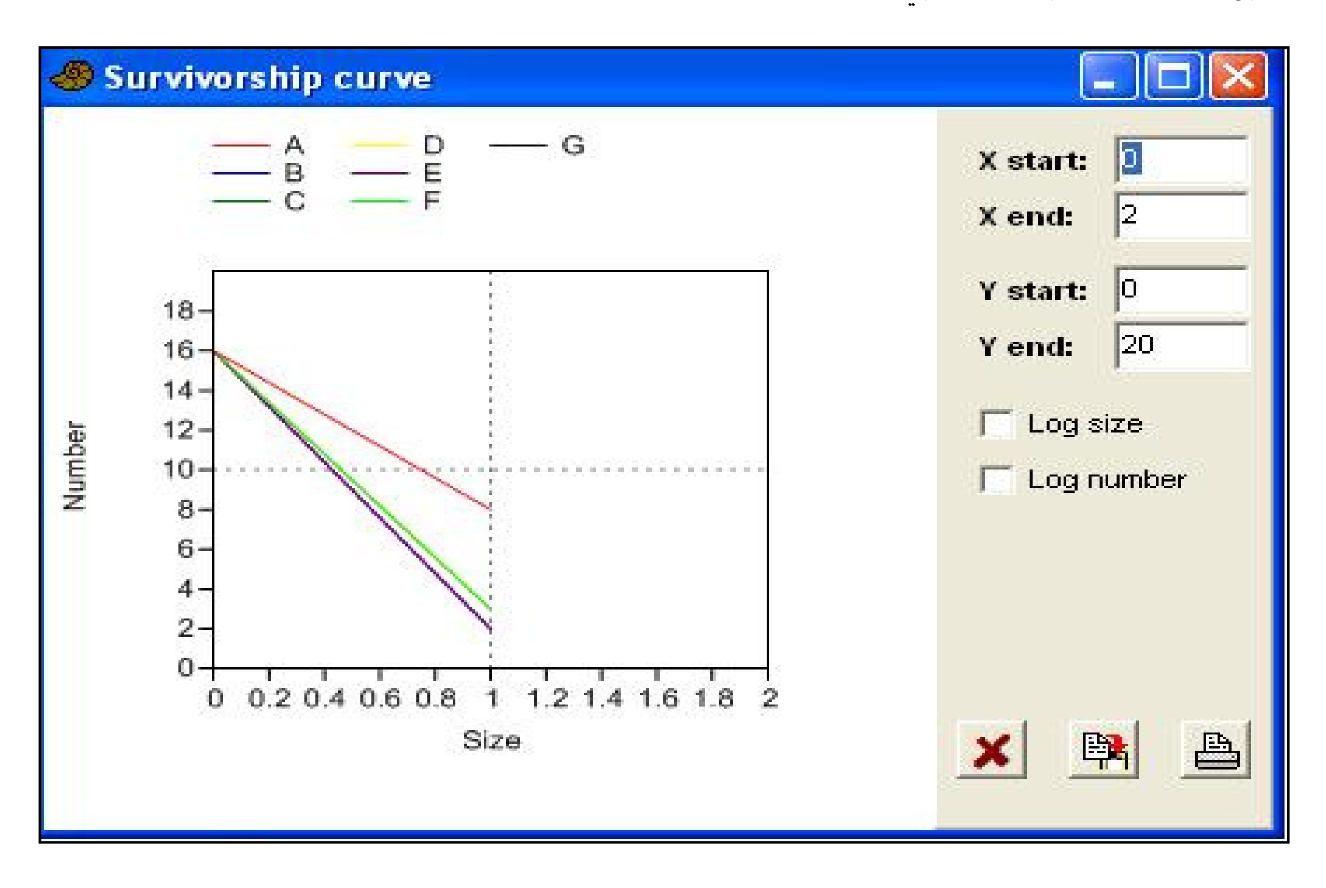


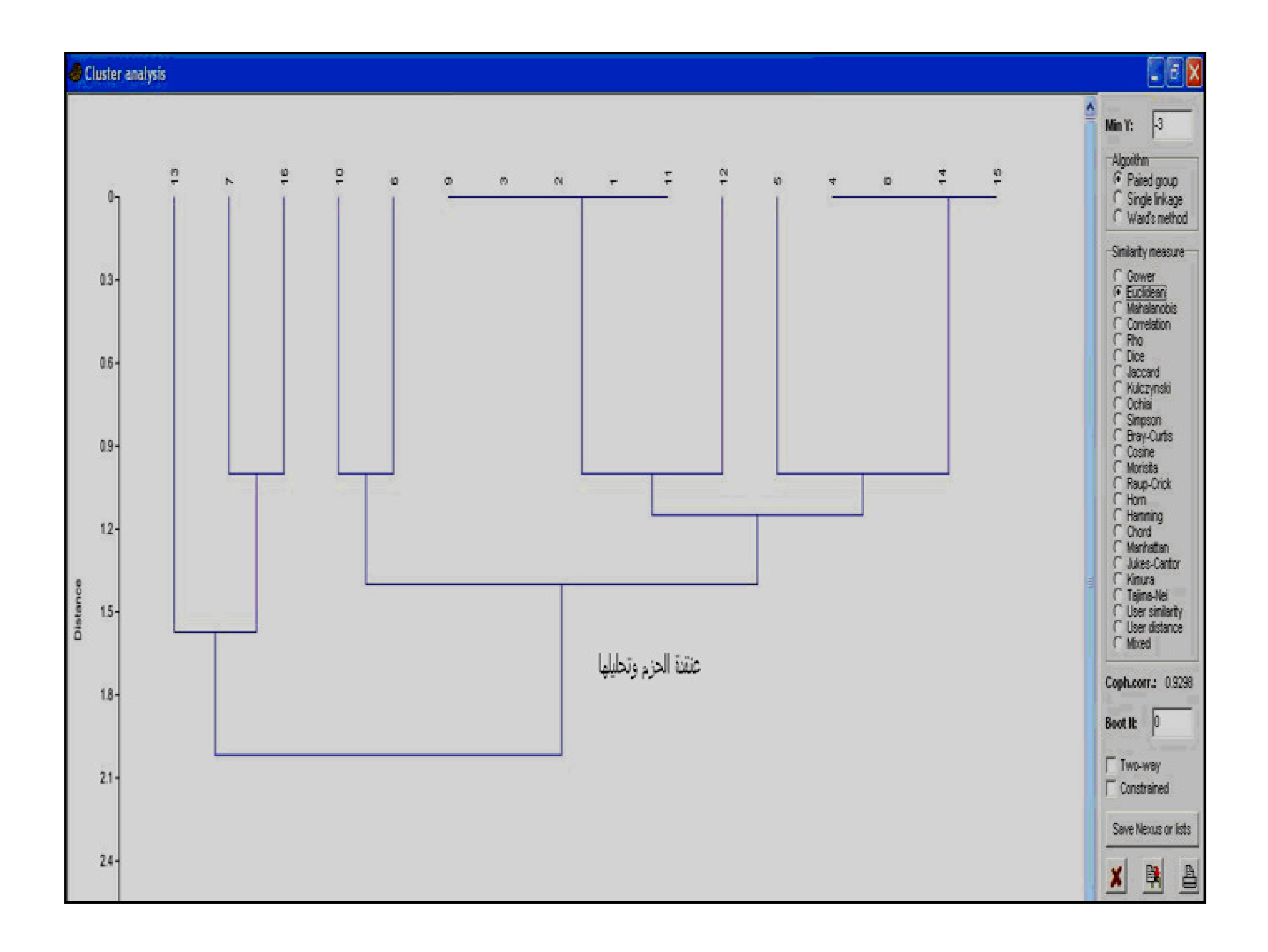
طريقة تسجيل الحزم بالنظام الثنائي

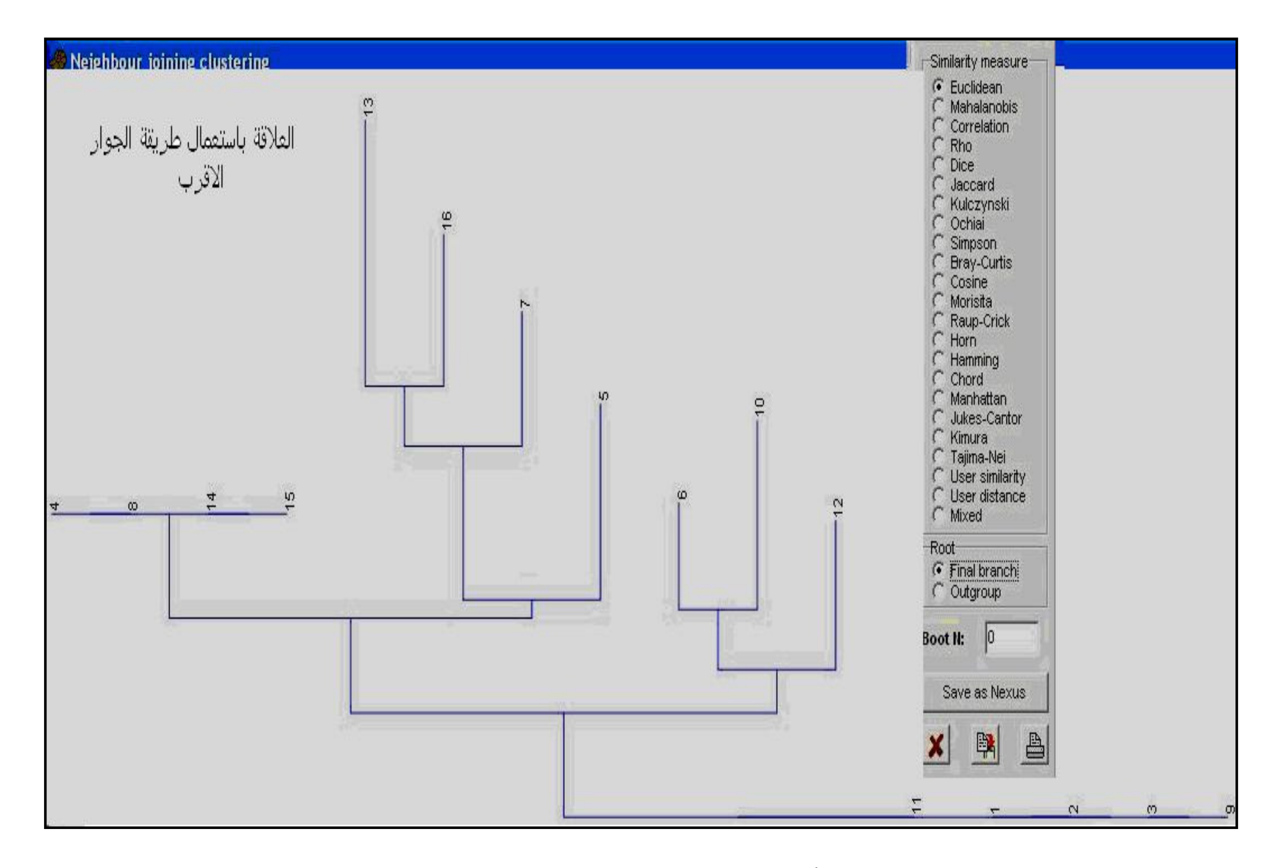




طرق حساب الانحراف المعياري




Cluster analysis
عنقدة الحزم وتحليلها
Distance
Min Y:
Algorithm
Paired group
Single linkage
Ward's method
Similarity measure
Gower
Euclidean
Mahalanobis
Correlation
Rho
Dice
Jaccard
Kulczynski
Ochiai
Simpson
Bray-Curtis
Cosine
Morisita
Raup-Crick
Horn
Hamming
Chord
Manhattan
Jukes-Cantor
Kimura
Tajima-Nei
User similarity
User distance
Mixed
Coph.corr.: 0.9298
Boot N:
Two-way
Constrained
Save Nexus or lists



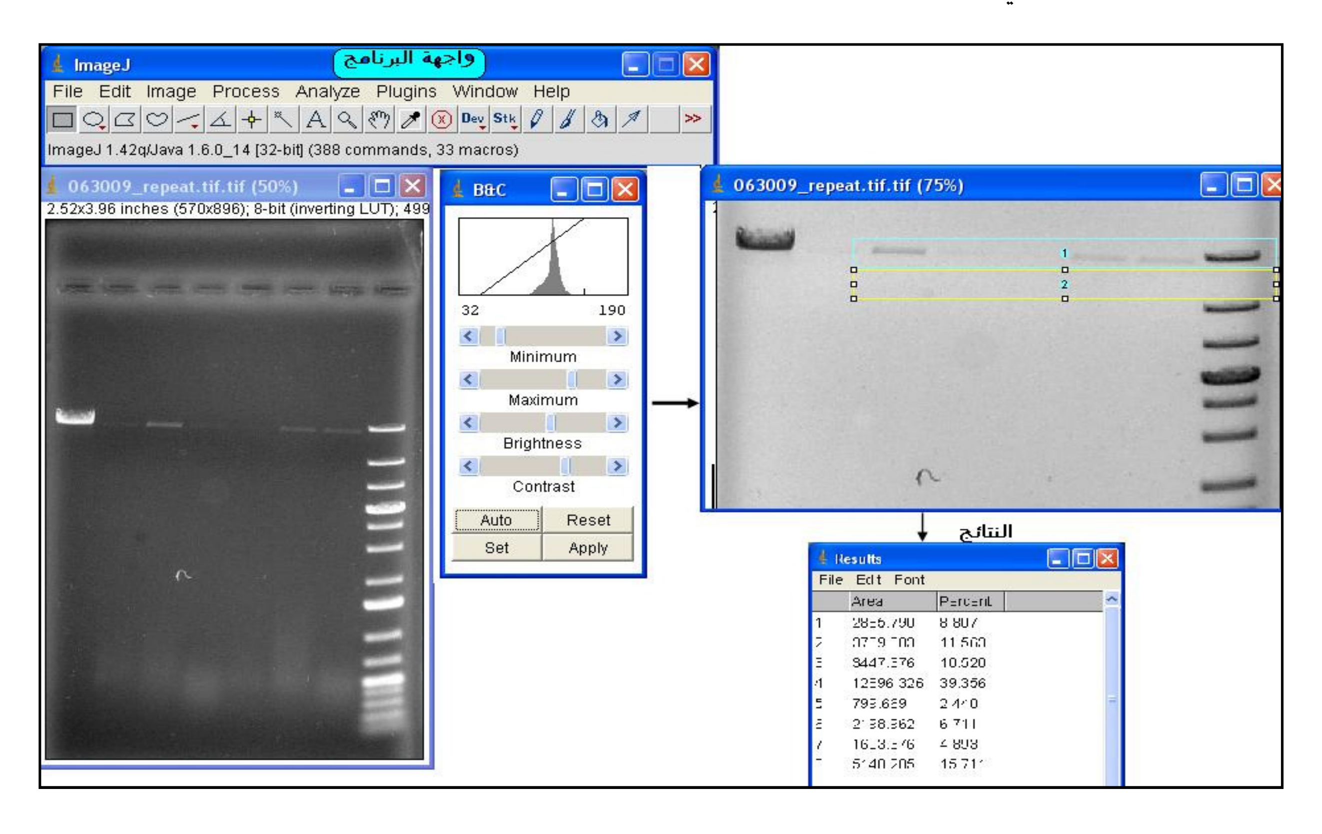
رسم العلاقات بطريقة الجوار الأقرب NJ

شكل 88 : مخرجات البرنامج Past

ثانيا : البرامج غير المعتمدة على Excel

وهذه برامج كثيرة ، لا تهمل النواحي الإحصائية وتكون متخصصة ومنها على سبيل المثال لا الحصر :

• **ImageJ** : برنامج يخدم في النواحي التطبيقية وغيرها لتحليل الصور ومنها تحليل صور الهلام أحادية البعد (1D) . يمكن استخدام عدة صيغ للصور المتوفرة ويتم اختيار الصيغة التي تعطي أفضل وضوح . وهذا البرنامج مزود بوسائل تساعد في تحسين الصور ، وفي البرامج تغير الصور الى اللون الرمادي (Gray scale) وهي صفة شائعة في اغلب البرامج .
يساعد البرنامج في حساب الوزن الجزيئي (بعد استعمال واسمات معرفة) وحساب معدل الجريان النسبي Rf والمساحة والنسبة المئوية . واجهة البرنامج و بعض الصفات المذكورة موضحة في الشكل 89



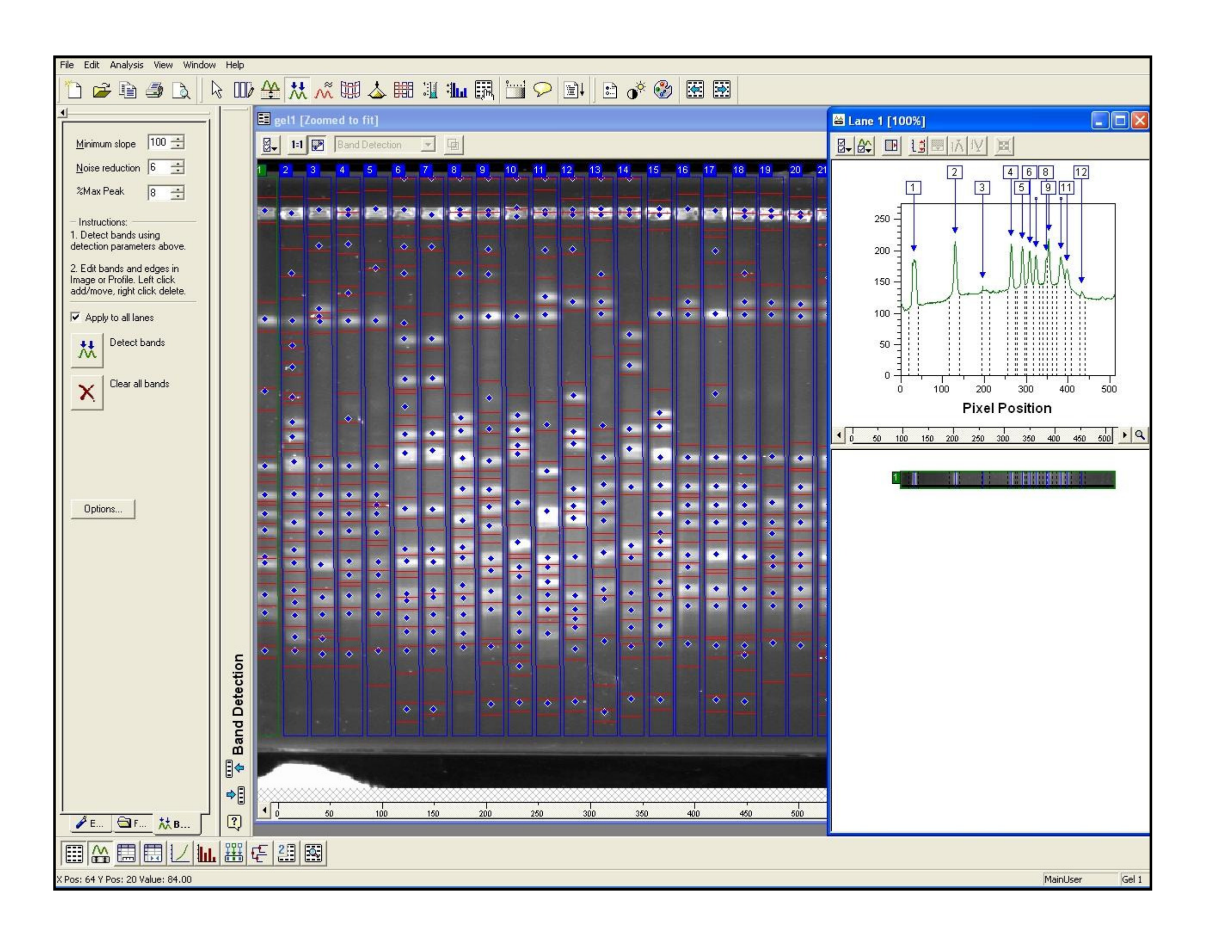
شكل 89 : واجهة ومعالجات البرنامج ImageJ لصور الهلام .

- **برامج Phoretix**

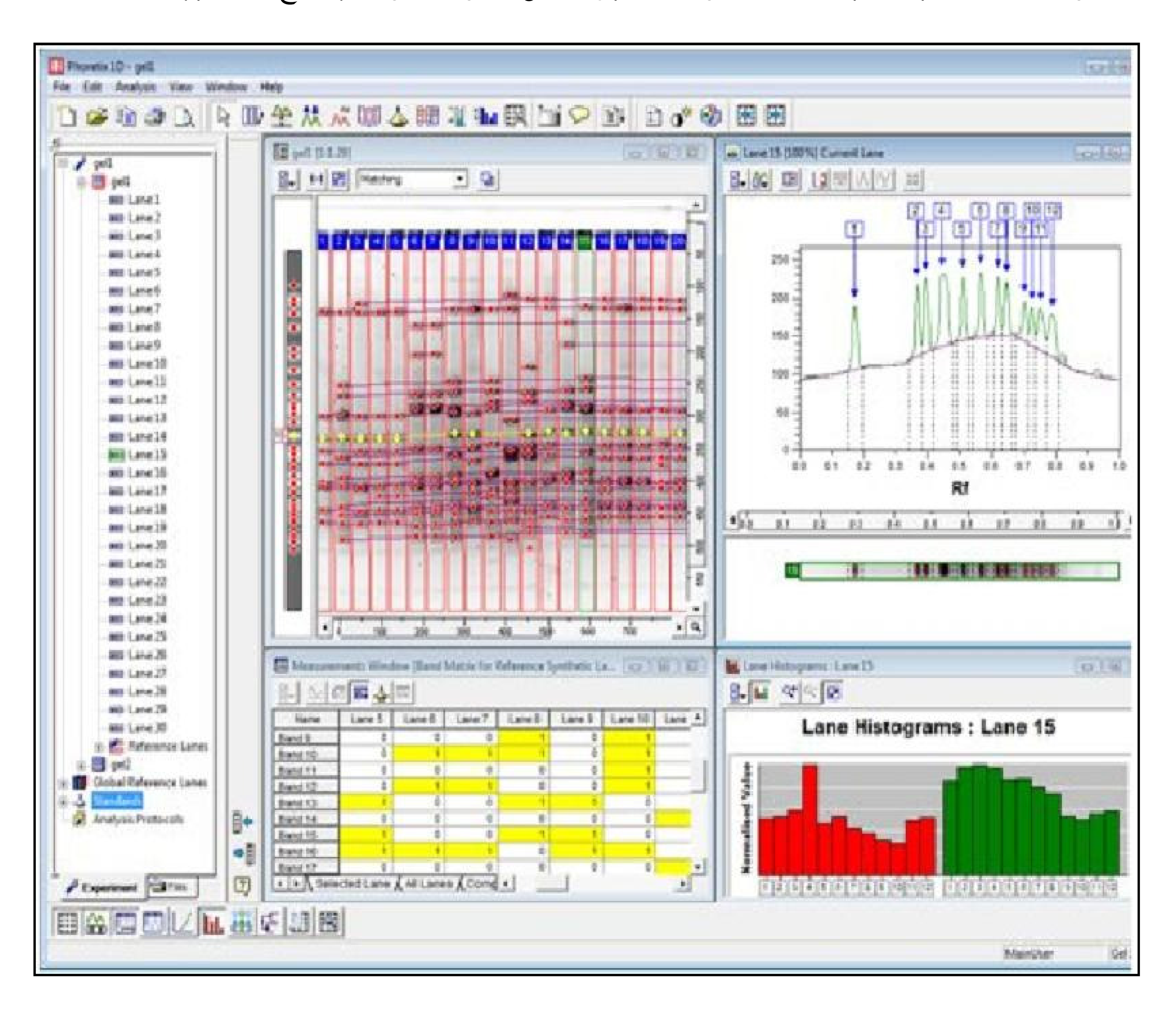
تتوفر من البرنامج أنواع خاصة بتحليل صور الهلام أحادي البعد (1D) وأخرى لتحليل صور الترحيل ثنائي البعد (2D) . وما يخص موضوع الكتاب هو النوع الأول . بعد إدخال الصور بالصيغ الملائمة التي يتقبلها البرنامج يمكن تحديد المسارات والحزم وفيه اختيارات كثيرة مثل قياس شدة الحزمة Pixel ومواقعها كما موضح في الشكل 72 .

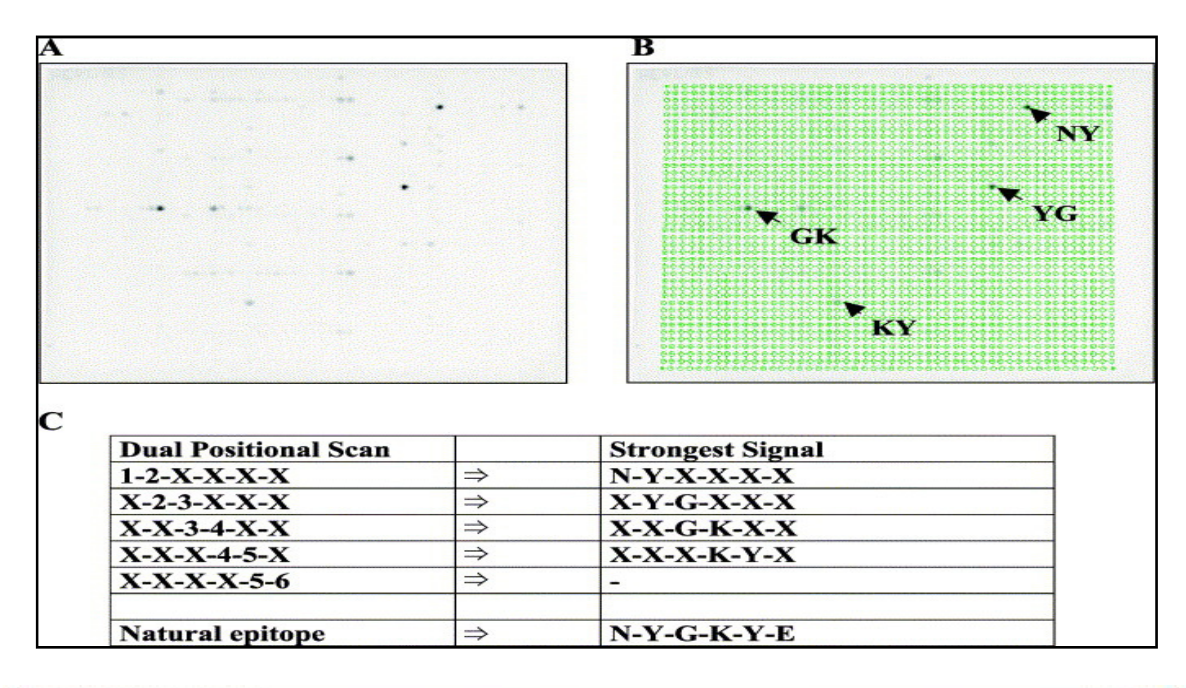
وللبرنامج مرونة أكثر في الحصول على المزيد من المعلومات عند استخدام الوسائل المزود بها كما يظهر في الشكل . وللبرنامج إمكانات كثيرة ، فالصورة يمكن ان تحول الى مصفوفات لونية وهذه المصفوفات يمكن ان تحول الى رسم أشجار تمثل العلاقة بين الحزم بشكل Dendrogram . فضلا ان إمكانات أخرى للبرنامج مثل إيجاد شدة Intensity لكل حزمة ، معظم هذه الإمكانيات موضحة في فقرات الشكل 90 .

الواجهة الأساسية لبرنامج Phoretix

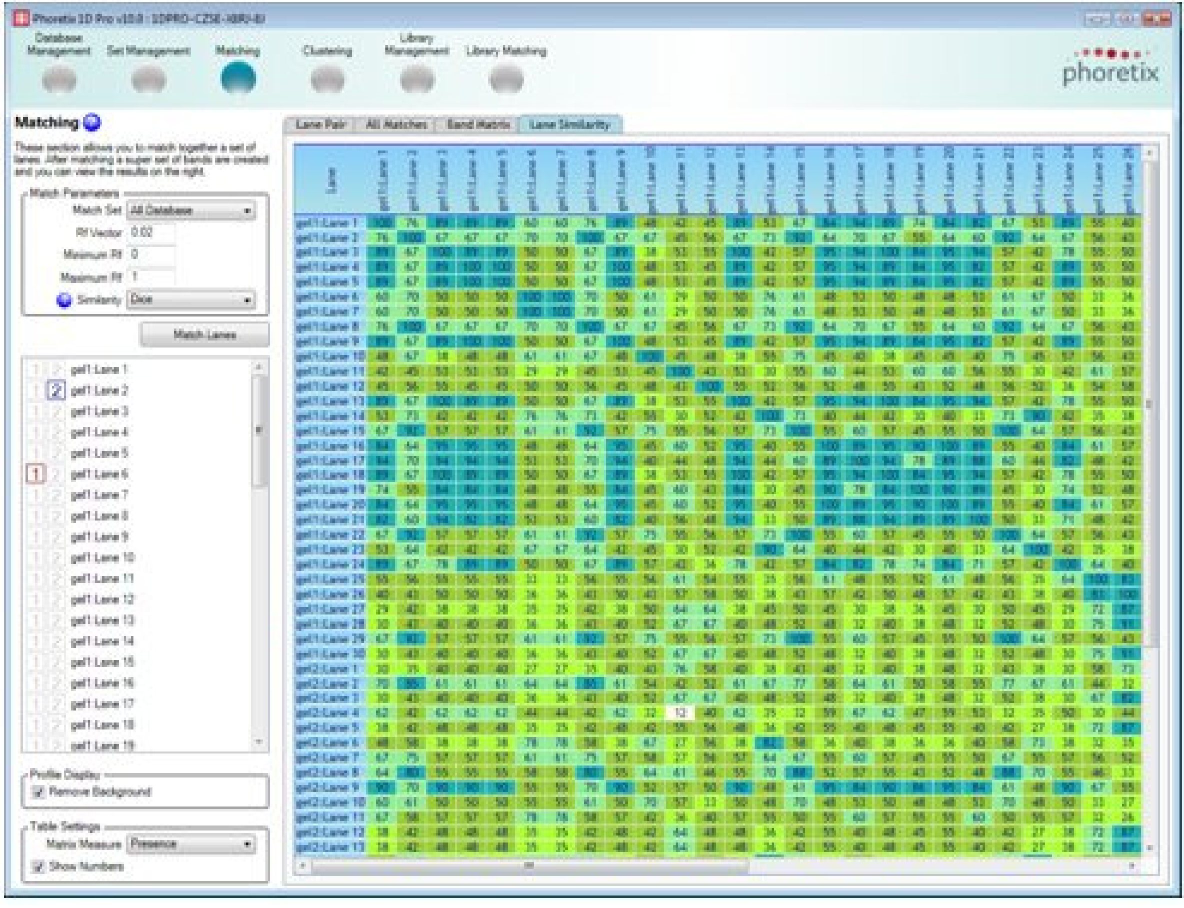


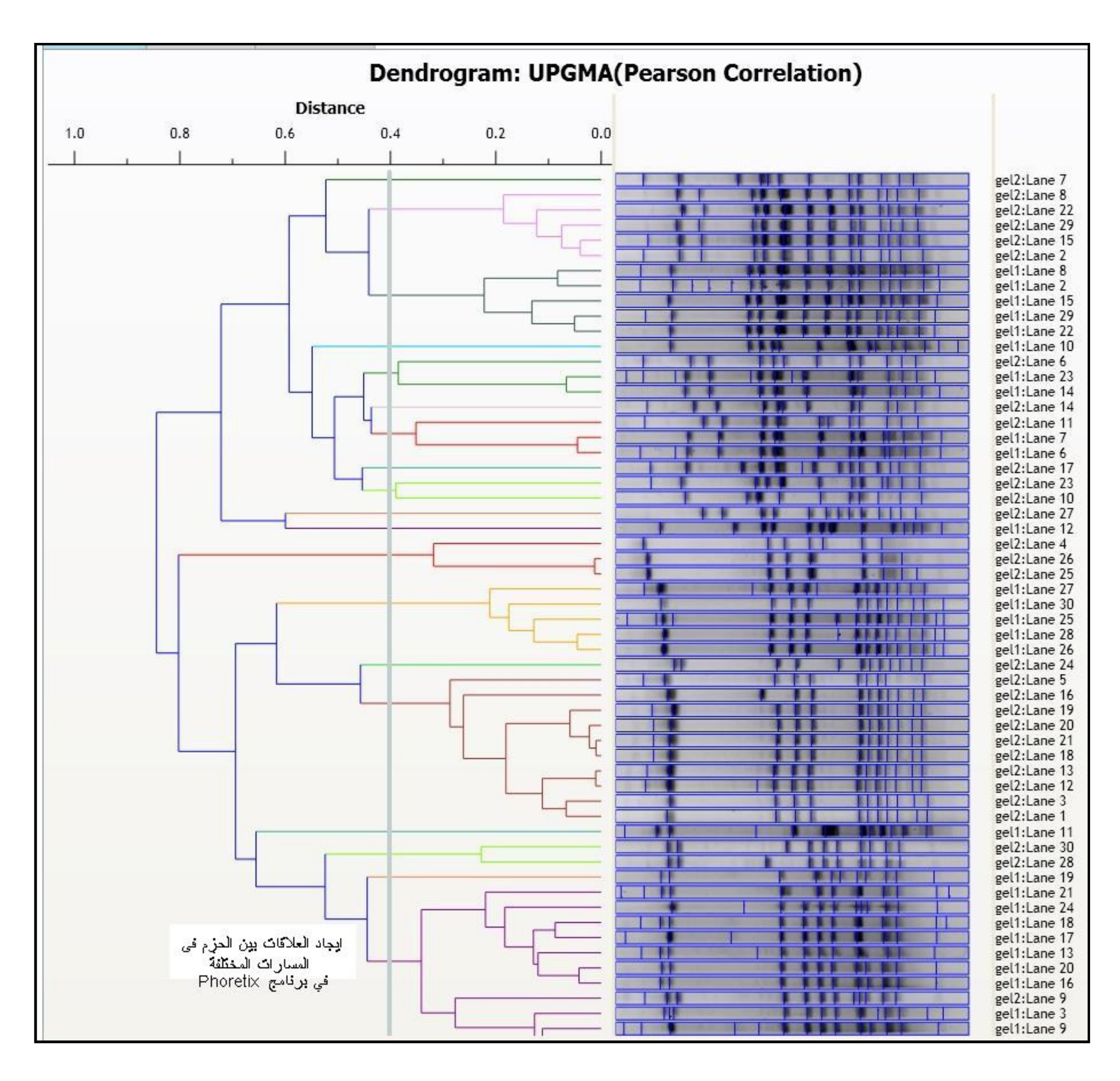
بعض القياسات والمعلومات الممكن الحصول عليها من تحليل البرنامج للصورة



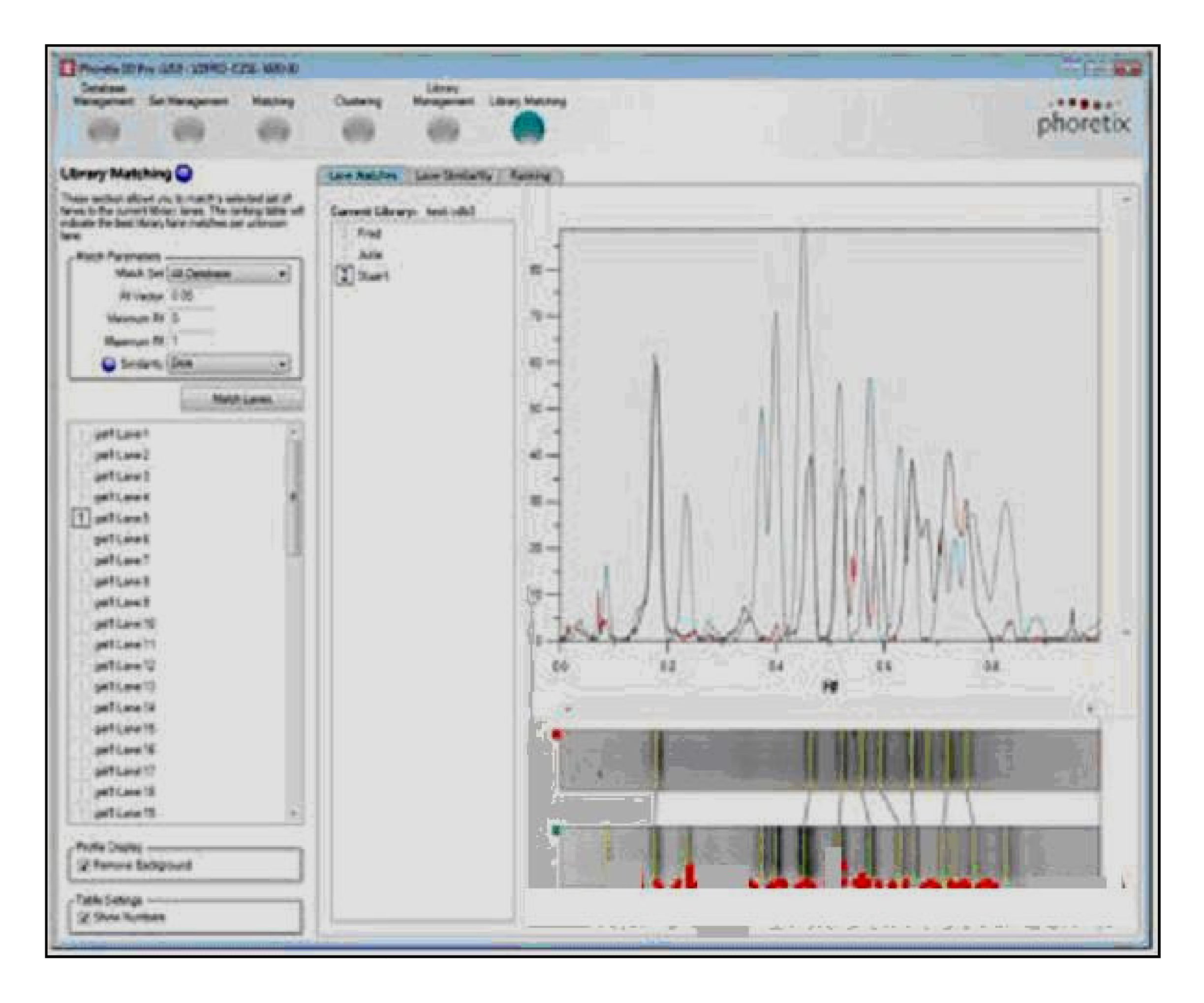


Dual Positional Scan		Strongest Signal
1-2-X-X-X-X	⇒	N-Y-X-X-X-X
X-2-3-X-X-X	⇒	X-Y-G-X-X-X
X-X-3-4-X-X	⇒	X-X-G-K-X-X
X-X-X-4-5-X	⇒	X-X-X-K-Y-X
X-X-X-X-5-6	⇒	-
Natural epitope	⇒	N-Y-G-K-Y-E





توزيع الحزم بعد ظهور Dendrogram وإيجاد العلاقات بينها باستعمال طريقة UPGMA



قياس شدة الحزم باستعمال Densitometry

شكل 90 : حزمة إمكانيات برنامج Phoretix

- **برنامج PyElph**

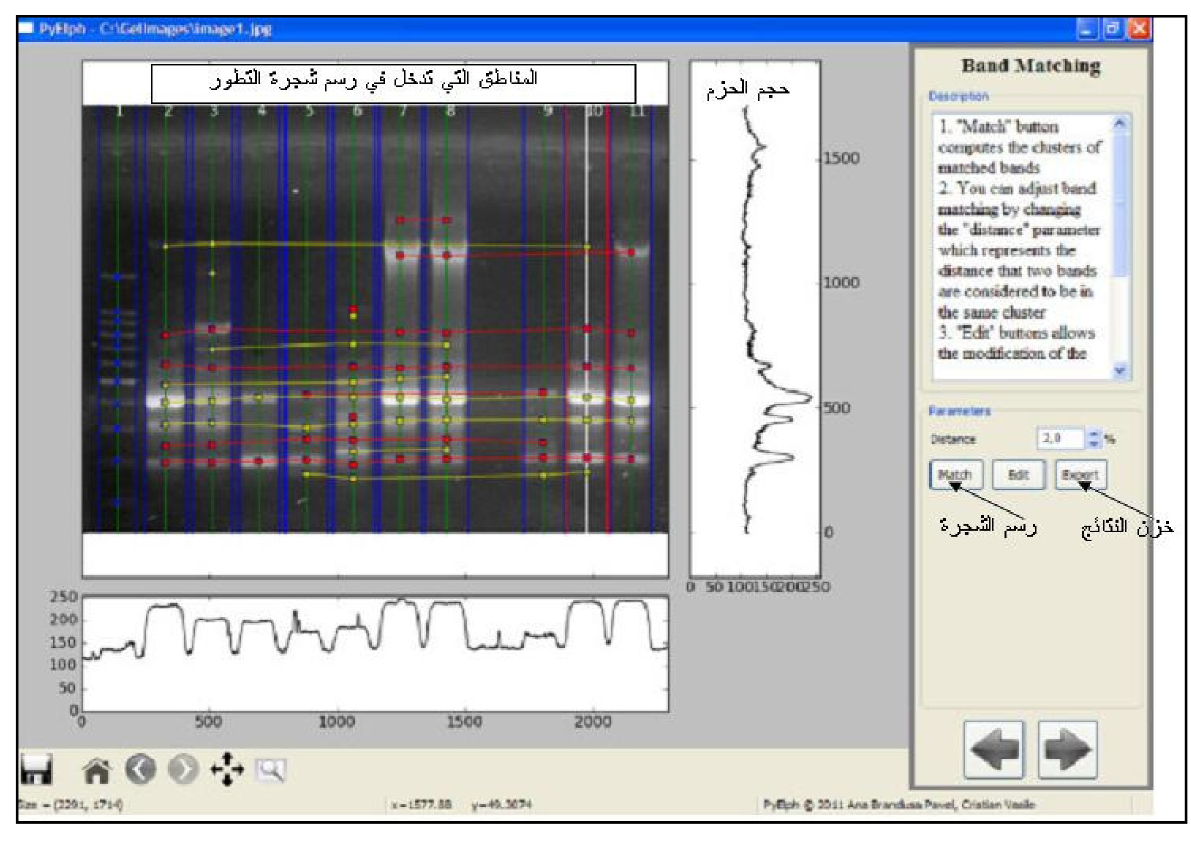
من البرامج التي تسهل إيجاد العلاقات التطورية بين الأحياء اعتمادا على صور الهلام والتي يجب ان تكون نماذجها متناسقة ، والبرنامج مكتوب بلغة Python ، ويمكنه تحليل جزيئات DNA من مصادر مختلفة باستعمال المعلومات والواسمات الموجودة في صور الهلام ويستعمل Graphic user Interface (GUI) البسيطة التصميم لجعل البرنامج سهل الاستعمال . البرنامج يستخلص أوتوماتيكيا البيانات من الصور لحساب الوزن الجزيئي للقطع وتحليلها .

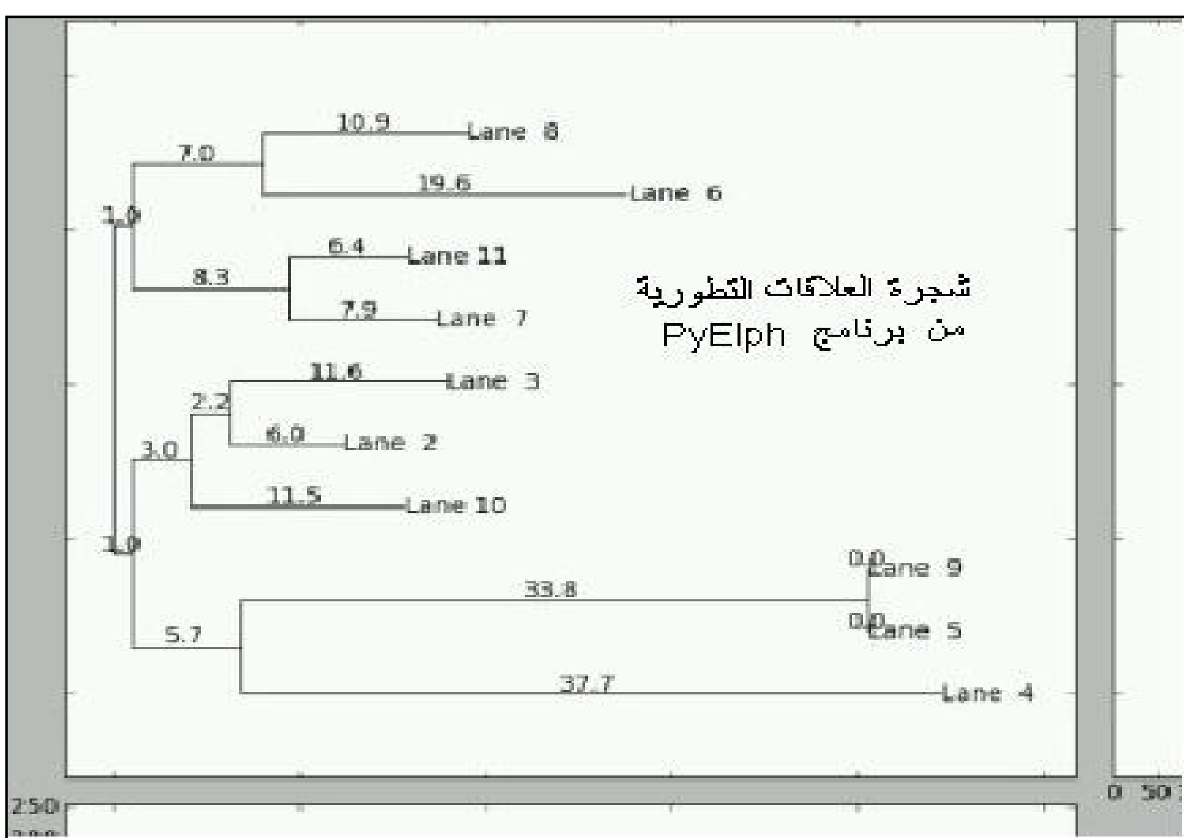
للبرنامج استعمالات كثيرة منها دراسة وراثة العشائر Population genetics والعلاقات التطورية والدراسات التصنيفية ويستعمل ايضا في :-

- تحليل نواتج أنواع من نتائج تفاعلات الكوثرة مثل RAPD، STR،AFLP وغيرها .
- يستعمل لتحديد التشابه بين تواليات DNA .
- يستغل الواسمات الوراثية لأغراض دراسية كثيرة وفحوص وراثية مثل تحديد الأبوة ، والشواهد الجنائية .
- دراسة التغاير داخل المجتمع وبين الأنواع .
- تحليل الصور من الكاميرات الرقمية .
- تحديد الوزن الجزيئي لكل حزمة اعتمادا على المسافة التي تقطعها .

يستعمل أكثر من طريقة لرسم العلاقات التطورية مثل ربط الجوار Neighbor joining (NJ) ، UPGMA ، WPGMA فضلا عن التزويد بالبيانات الإحصائية المرافقة لرسم الأشجار .

واجهة البرنامج واستعمالاته موضحة في الشكل التالي ، والأشجار الممكن الحصول عليها موضحة في الشكل 91

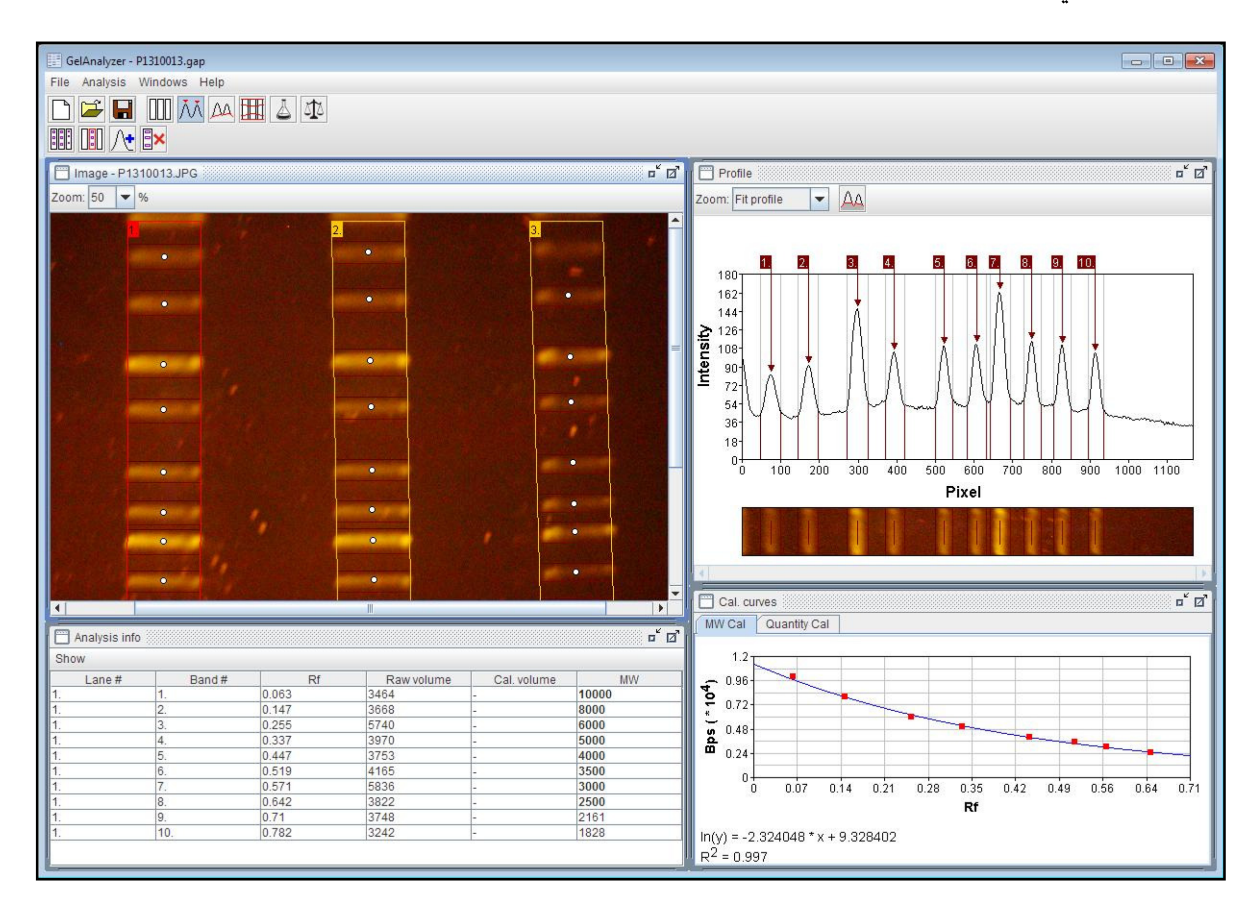




شكل 91 : برنامج PyElph

- **برنامج Gel analyzer**

من برامج تحليل صور الهلام ، وليس في البرنامج خاصية تحليل التطور Phylogenetic analyzing ولكن يمكن ان يحدد شدة الحزم وتحديد الوزن الجزيئي ، ويعتمد في تحديد الوزن الجزيئي على حساب المسافات التي تتحركها الحزم ، بعد ان يزود بقيم أطوال حزم سلم الواسمات وهو شائع في أجهزة Gel documentation systems وواجهة البرنامج موضحة في الشكل 92 .



شكل 92 : برنامج Gel analyzer

• برنامج **GelQuest**

البرنامج يكون مخصصاً للعمل في تحديد البصمة الوراثية وما يتعلق بها من تفاعلات الكوثرة ، فهو يستعمل في تحليل صور الهلام الناتجة من :

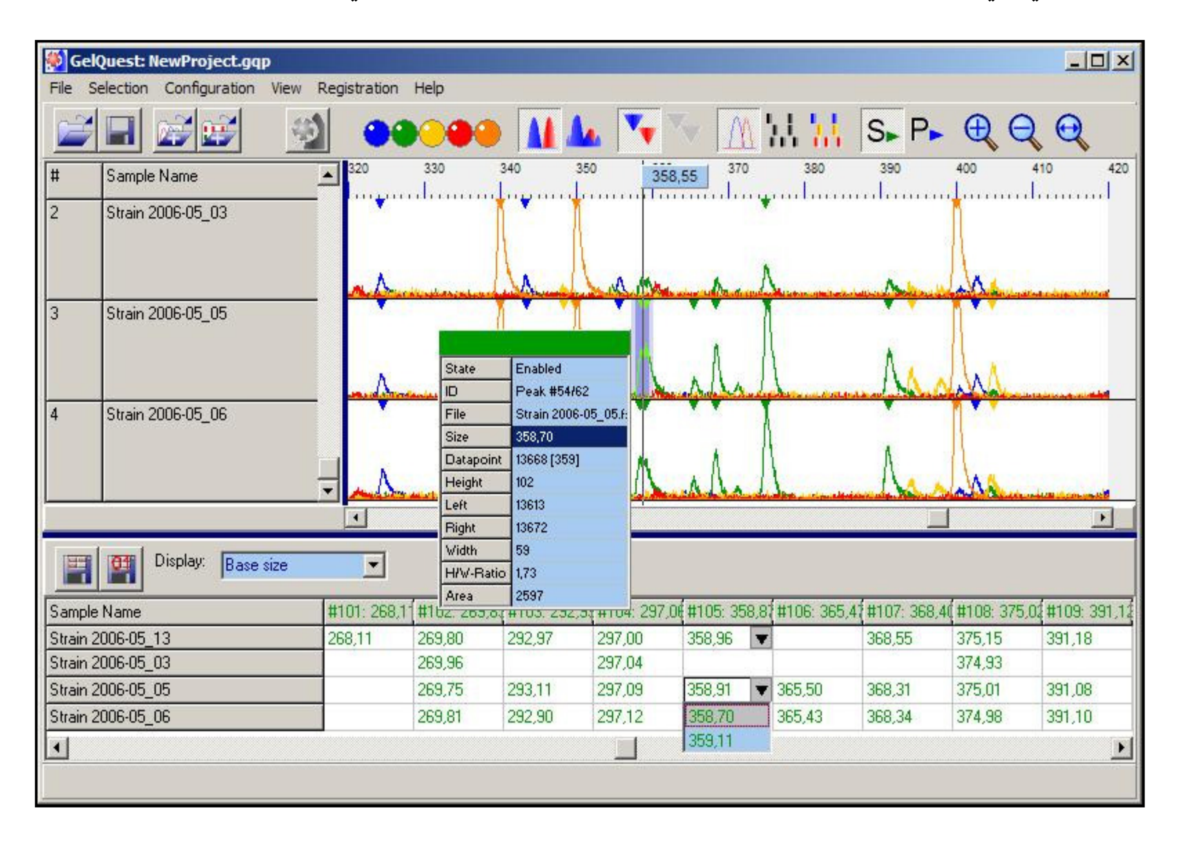
Amplification fragment length polymorphism (AFLP)

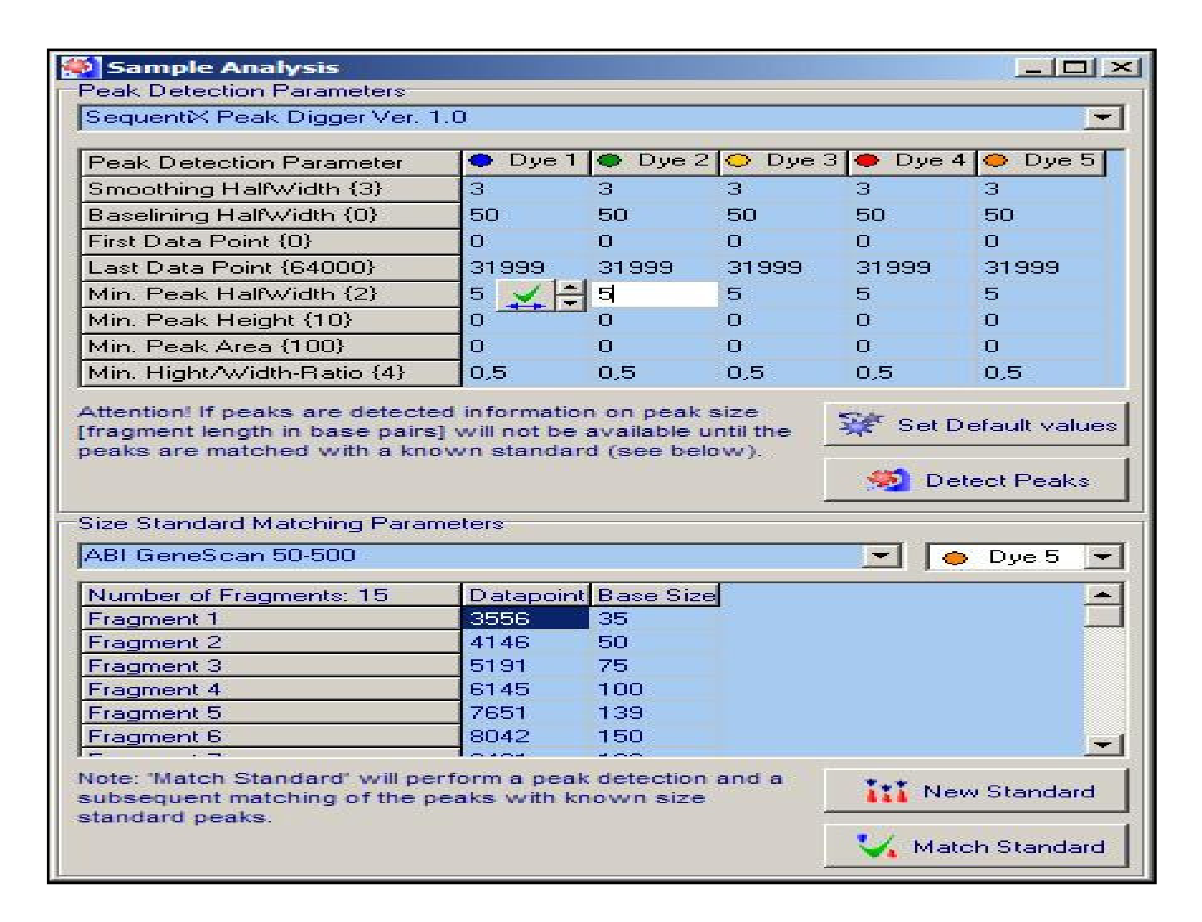
Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

Terminal restriction fragment length polymorphism (tRFLP)

Pulsed field gel electrophoresis of chromosomes (PFGE)

Variable number tandem repeats (PFGE) وكذلك تحليل نواتج التوابع وMicrosatellite والبرنامج يتقبل عدة صيغ من الصور ، كما ان النتائج تكون شاملة لعدة نواحي في الحقل الذي يستخدم فيه ، البعض موضح في الشكل 93

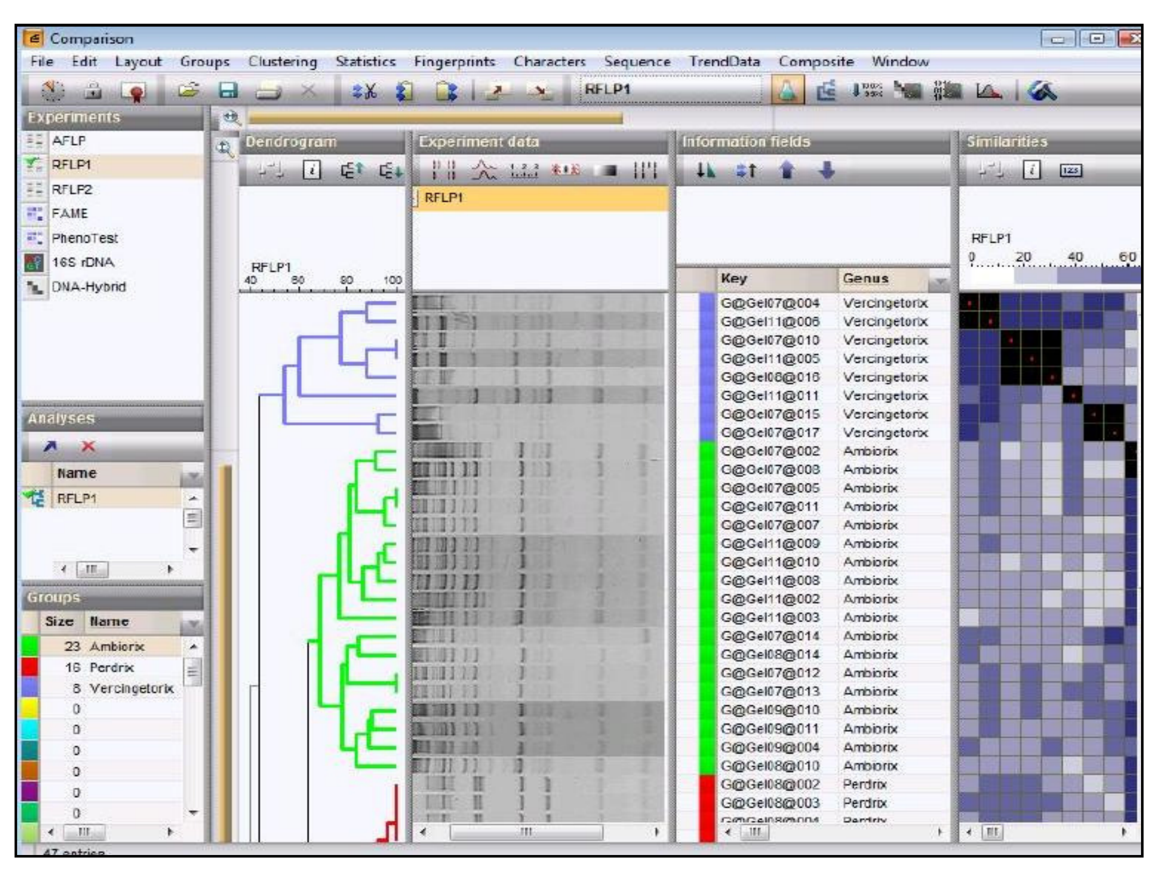


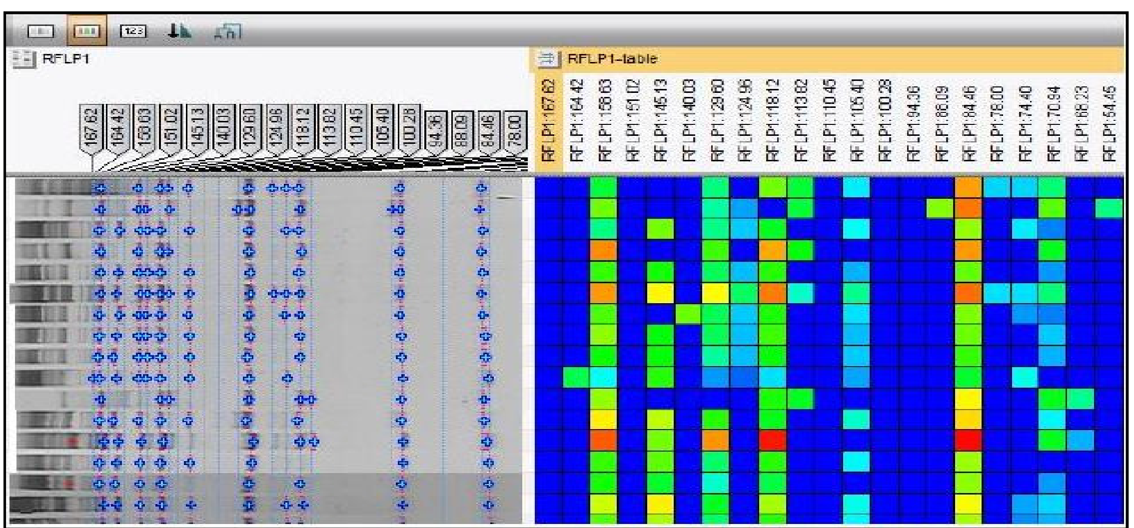


شكل 93 : برنامج GelQuest

• برنامج **Gel Compare**

من البرامج الجيدة لدراسة المقارنة بين مسارات ترحيل الهلام ، وتختلف مخرجات البرنامج عما ذكر سلفا خاصة في تحديد شدة الحزمة . ويوفر البرنامج إمكانية عنقدة الحزم لإنتاج Dendrogram . ويمكن ان يستعمل مع طرق خاصة مثل RFLP (شكل 94) .

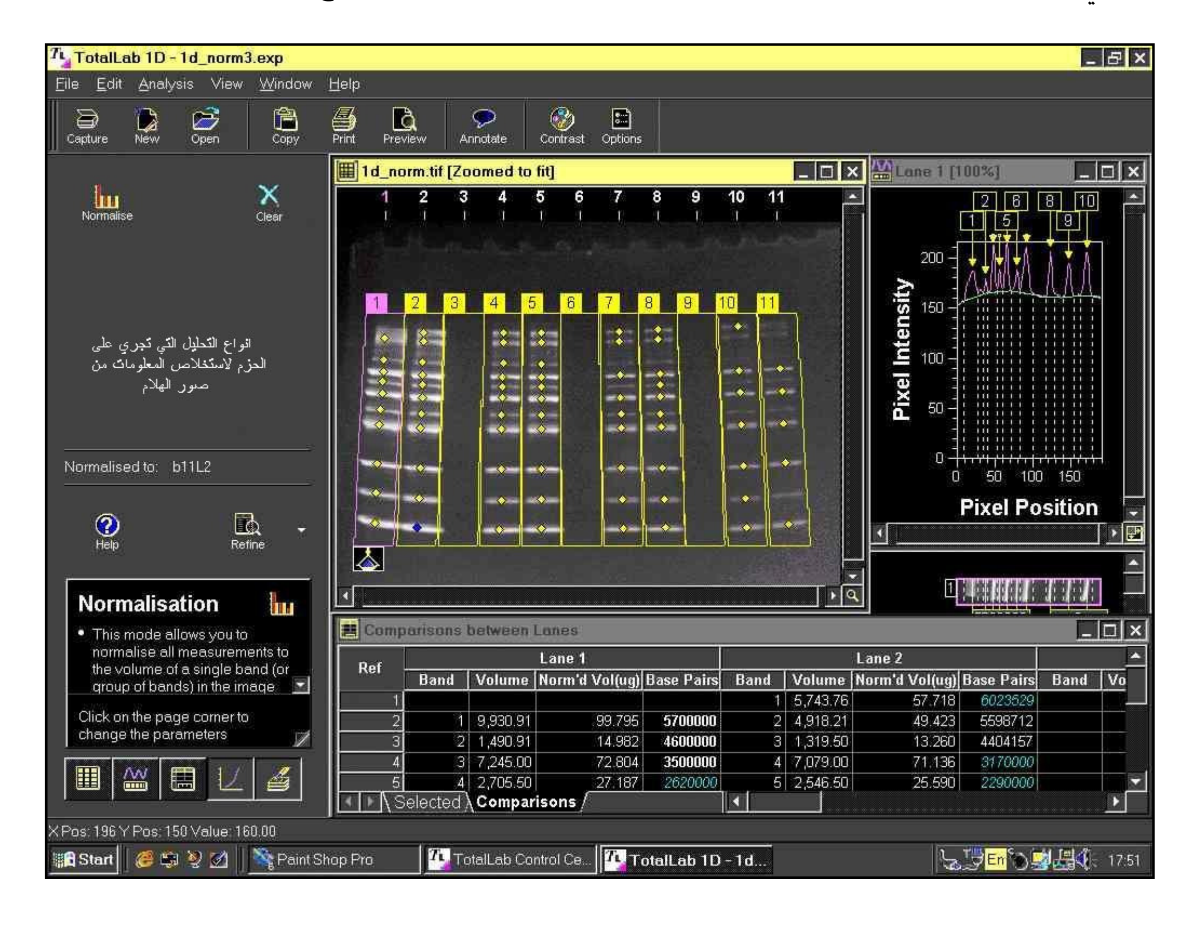


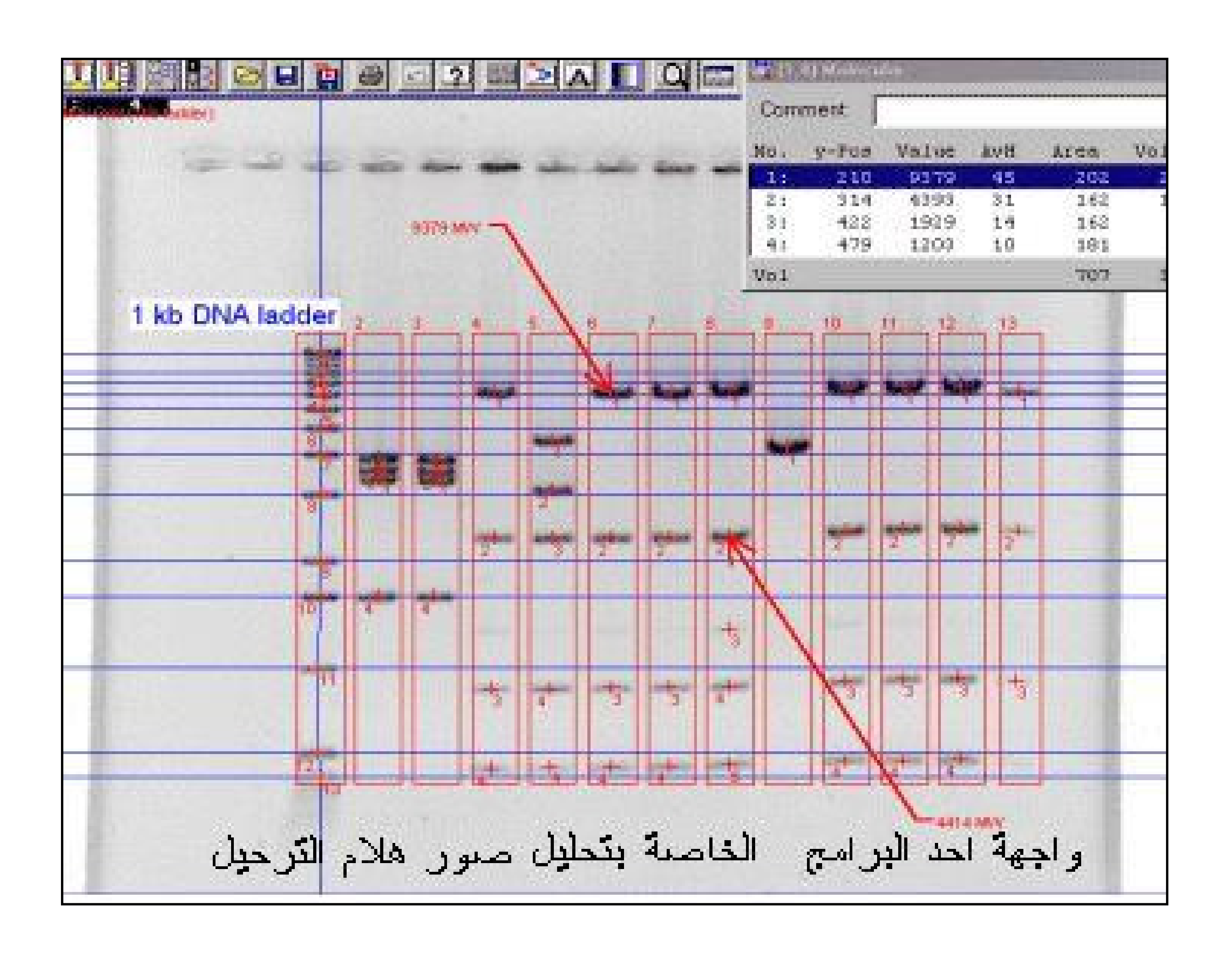


شكل 94 : برنامج Gel Compare

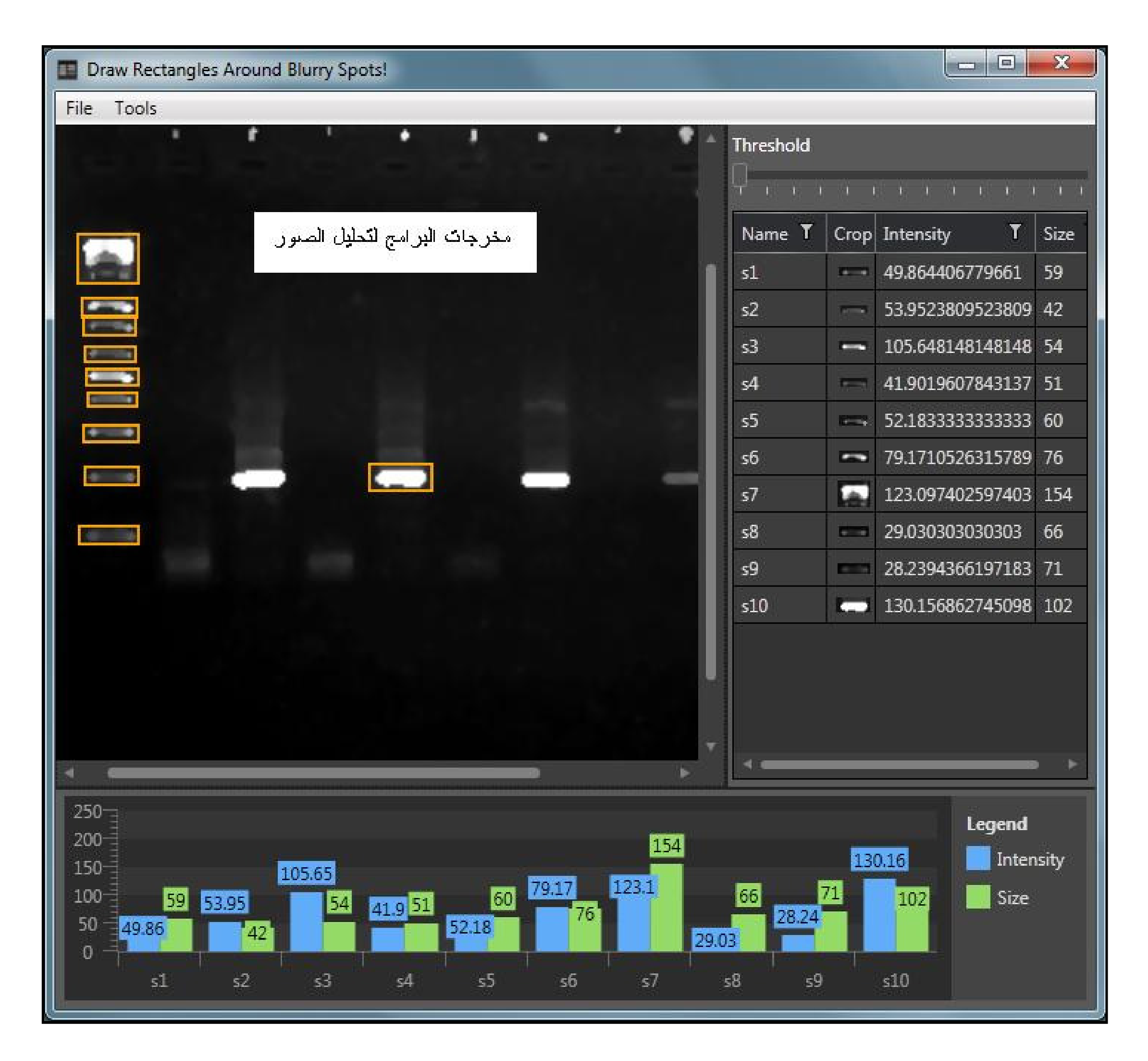
• برامج أخرى

كما ذكر في مستهل الموضوع ان البرامج الموجودة كثيرة جدا ومرشحة للزيادة وتختلف سواء في طريقة التحليل او نوعية مخرجاتها والشكل 95 يوضح بعضها .





واجهة احد البرامج الخاصة بتحليل صور هلام الترحيل



شكل 95 : واجهات بعض البرامج التي تقدم إمكانيات أخرى –ربما– لا توجد في البرامج الأخرى .

وفي الجدول التالي مواقع الانترنيت للبرامج المذكورة مع برامج إضافية تعنى بتحليل الصور يمكن الاستفادة منها لأغراض مختلفة .

جدول 6 : المواقع الالكترونية لبعض البرامج الخاصة بتحليل الصور

البرامج	Websites
GENtle	http://gentle.magnusmanske.de/GENtleSetup.exe
Band Leader	http://en.bio-soft.net/draw/BandLeader.html
Cross Checker	http://en.bio-soft.net/draw/CrossChecker.html
developer.imagej.net	http://developer.imagej.net/
GelAnalyzer	http://en.bio-soft.net/draw/gela.html او http://www.gelanalyzer.com
GelQuest 3.0.4	http://en.bio-soft.net/draw/gelquest.html
QuantiScan	http://en.bio-soft.net/draw/QuantiScan.html
TinyQuant	http://en.bio-soft.net/draw/TinyQuant.html
TotalLab	http://en.bio-soft.net/draw/TotalLab.html

مستقبل تفاعلات الكوثرة

هناك العديد من المشاكل في تفاعلات الكوثرة قد تم التغلب عليها . فهناك إمكانيات تضخيم عدة آلاف من القواعد من جزيئات DNA للعديد من الأحياء . وقد أمكن جعل اغلب خطوات التفاعل تتم بشكل أوتوماتيكي واختصر الوقت من أيام للحصول على كميات معينة من تواليات معينة من DNA بطريقة الكلونة الى ساعات قليلة بتفاعل PCR . ولكن لا تزال العملية مقتصرة على المختبرات ذات التجهيز الجيد .

ولذلك يحاول العديد من الباحثين جعل تفاعلات الكوثرة التي تتم خارج الأنظمة الحية أكثر محاكاة لما يحدث داخل الأنظمة الحيوية فاليوم يوجد (HDA) Helicase–dependent amplification للتخلص من المسخ الحراري والاستعاضة عنه بالمسخ الإنزيمي ولكن لا تزال التغيرات الحرارية لازمة للخطوات اللاحقة . لذلك فالجهود تبذل لإيجاد إمكانية إتمام عملية الكوثرة في وعاء واحد بدرجة حرارية واحدة وذلك بالاستعانة بإنزيمات الكوثرة المختلفة ومساعدة البروتينات الرابطة وغيرها مثل تلك التي ترتبط الى الأشرطة المفردة بعد عمل إنزيم Helicase وغيرها لجعل عملية الكوثرة تتم في الوحدات المتنقلة مثل الحقول او وحدات العناية الصحية وغيرها من المجالات التي تحتاج مثل هذه التقنية .

الفصل الثامن	
أمثلة على تصميم بوادىء خاصة	
تصميم بوادىء للاكسونات ومكونات الجين الأخرى	
تصميم بوادىء للتواليات المكررة **Alu sequences**	
إيجاد البوادىء لتغايرات النيوكلوتيد المفرد **SNP**	
إيجاد البوادىء الخاصة ببعض الجينات البكترية	

أمثلة على تصميم بواديء خاصة

هناك العديد من الأغراض لتصميم البواديء وإنتاج المتضخمات ، فضلا عن اختلاف مصادر جزيئات DNA المرام تحديد بواديء لتضخيمها ، وفي كل الأحوال ينبغي الحصول على تواليات هذه الجزيئات سواءا بشكل مباشر او غير مباشر لغرض تصميم بواديء لها . وبعض البرامج تكون مرتبطة بقواعد بيانات خاصة لذلك وجب الحصول على الرقم التعريفي للجزيئة واستعماله بدلا من التوالي الحقيقي (أي الحالة غير المباشرة) كما في استعمال NCBI . وللوصول الى الهدف (DNA) توجد طرق متعددة . وبعد الحصول على البواديء يجب التأكد منها قبل الاستعمال مثل استعمال عمليات الاصطفاف مع قواعد البيانات العامة ، ثم يلي ذلك تطبيق الشروط العامة على مواصفات البواديء المصممة بإدخالها في برامج مختلفة لتحديد مواصفاتها ، وفيما يلي وصف بسيط لبعض الحالات :

تصميم بواديء للاكسونات ومكونات الجين الأخرى

في هذه الحالة لابد من معرفة الجين ورمزه للحصول على التواليات الخاصة به ، او معرفة الرقم التعريفي في قاعدة البيانات المرجعية . وفي هذه الحالة اختير الجين CHRNA7 في الإنسان *Homo sapiens* ، فبداية لابد من الحصول على معلومات وافية عن الجين الحاوي على 5–10 من الاكسونات فضلا عن احتواءه على STS (Sequence-tagged site) ، ولهذه الغاية يتم البحث عن الجين في قاعدة بنك الجينات GenBank والحصول على صيغة الجين وتواليه ، والمعروف ان GenBank format تعد أفضل الصيغ من حيث توفير المعلومات . لذلك يتم البحث عن الجين في الموقع NCBI بشكل مباشر (او في موقع الاتحاد الأوربي EMBL بشكل غير مباشر) تحت فقرة Gene من الستارة المنسدلة او تحت فقرة Nucleotide . ففي الحالة الأولى تتوفر للجين رسم او صورة Graphics ، وفي جميع الأحوال ومن الروابط المتوفرة يمكن الحصول على صيغة بنك الجينات وكذلك صيغة FASTA التي تستعمل في اغلب البرامج . والفقرة التالية توضح جزء من المعلومات الخاصة بالجين

Homo sapiens CHRNA7 (cholinergic receptor...
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_148911.1

Display Settings: GenBank

Homo sapiens CHRNA7 (cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7, exons 5-10) and FAM7A (family with sequence similarity 7A, exons A-E) fusion (CHRFAM7A), transcript variant 2, mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_148911.1

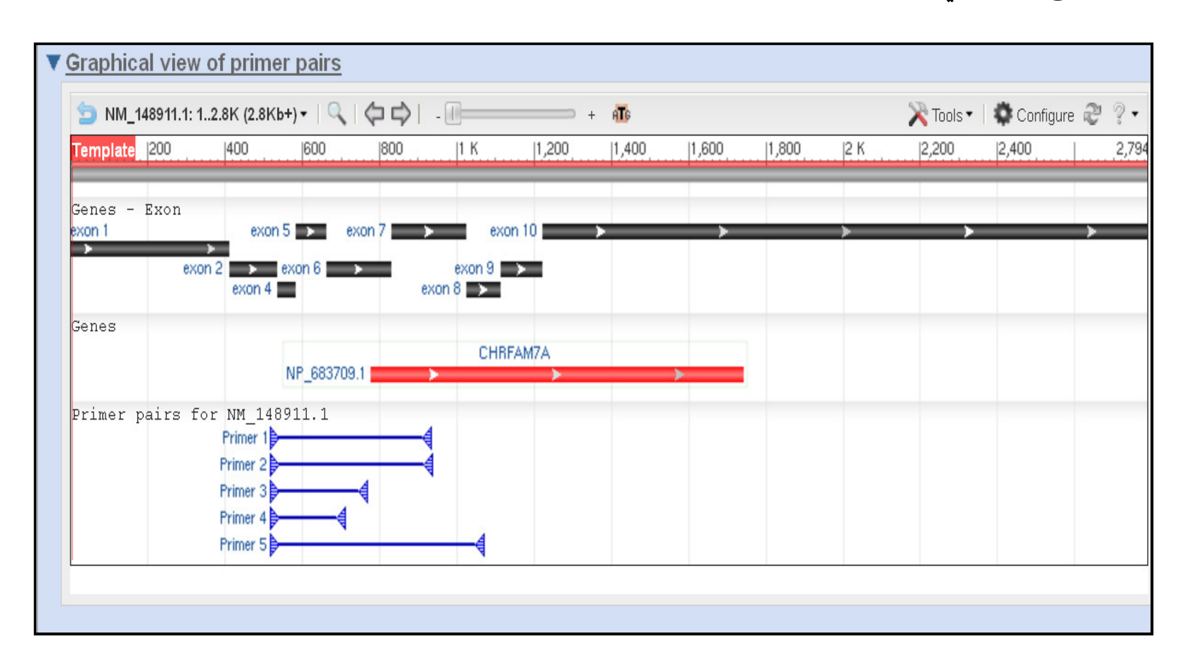
FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       NM_148911              2794 bp    mRNA    linear   PRI 30-JUN-2012
DEFINITION  Homo sapiens CHRNA7 (cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7,
            exons 5-10) and FAM7A (family with sequence similarity 7A, exons
            A-E) fusion (CHRFAM7A), transcript variant 2, mRNA.
ACCESSION   NM_148911
VERSION     NM_148911.1  GI:23312389
KEYWORDS    .
SOURCE      Homo sapiens (human)
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
            Catarrhini; Hominidae; Homo.
```

```
gene                1..2794
                    /gene="CHRFAM7A"
                    /gene_synonym="CHRNA7; CHRNA7-DR1; D-10"
                    /note="CHRNA7 (cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7,
                    exons 5-10) and FAM7A (family with sequence similarity 7A,
                    exons A-E) fusion"
                    /db_xref="GeneID:89832"
                    /db_xref="HGNC:15781"
                    /db_xref="HPRD:18704"
                    /db_xref="MIM:609756"
exon                1..410
                    /gene="CHRFAM7A"
                    /gene_synonym="CHRNA7; CHRNA7-DR1; D-10"
                    /inference="alignment:Splign"
                    /number=1
STS                 302..1976
                    /gene="CHRFAM7A"
                    /gene_synonym="CHRNA7; CHRNA7-DR1; D-10"
                    /db_xref="UniSTS:487145"
exon                411..535
                    /gene="CHRFAM7A"
                    /gene_synonym="CHRNA7; CHRNA7-DR1; D-10"
                    /inference="alignment:Splign"
                    /number=2
misc_feature        530..532
```

وعادة يرافق ظهور بيانات الجين بأي صيغة كانت إمكانيات وروابط تساعد في إجراء الاصطفاف Alignment باستعمال BLAST او الحصول على البوادىء Pick primer . وهنا تكون القاعدة ملائمة لان الطريق سيكون سهلا والأمور مضبطة للحصول على البوادىء وبعيدا عن مشاكل البرامج الأخرى وعدم توافق الصيغ . والشكل التالي (شكل 96) يوضح البوادىء المصممة للجين كله



شكل 96 : بوادىء الجين الكامل

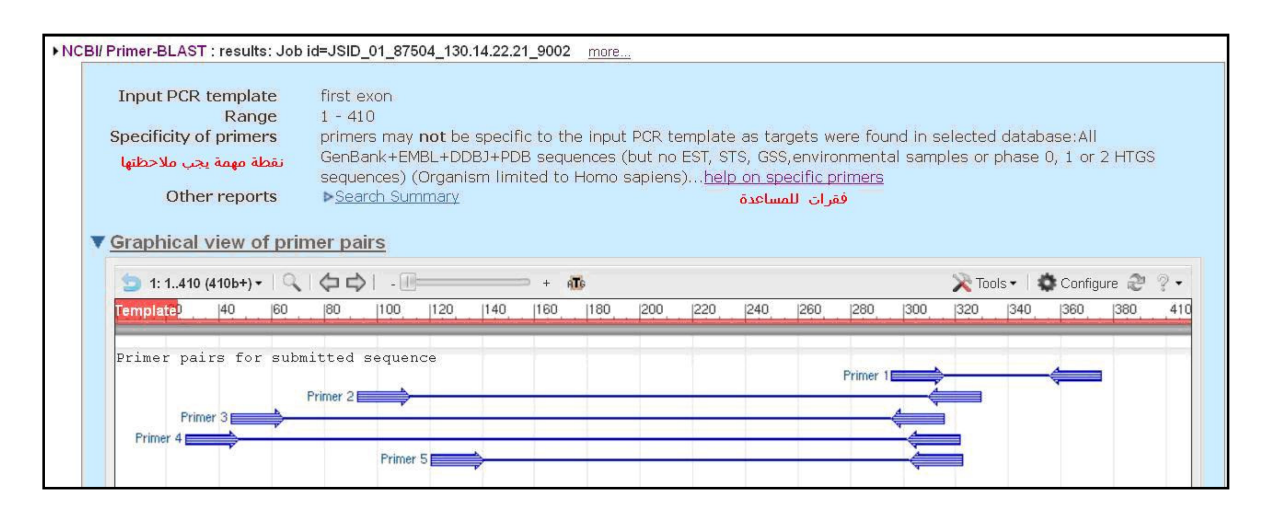
اما عندما يراد تصميم بوادىء لاكسونات خاصة في هذا الجين فيحدد رقم او موقع الاكسون (فقرة الوصف أعلاه) . التي توضح مواقع الاكسونات فمثلا الاكسون الأول يشغل التوالي من 1- 410 . وعند النقر على exon يظهر تواليه مظللا كما في الفقرة الآتية

```
                    /standard_name="D15S937"
                    /db_xref="UniSTS:153848"
     STS            2376..2776
                    /gene="CHRFAM7A"
                    /gene_synonym="CHRNA7; CHRNA7-DR1; D-10"
                    /standard_name="CHRFAM7A_s9"
                    /db_xref="UniSTS:510361"
ORIGIN
        1 agccctttcc caggcggtag cggggcagt ggtgctgttg cccttttaaa ctgcggcttg
       61 acgggagccg cgcctcctgt cggtggagtc ggttataaag ggagcagccc cgcaggccgc
      121 cacatagctc ccgccaagtc ctcggtgccc cttgccattt tccagccgcg ctcccacgag
      181 ggtcacggcg gcggggagag gtggagccgc gagagctcgg ccgggggccc cgcctggtgg
      241 tcgcggccat gacagcggct cgggacaggc tccttttccg cgcccctccc gccggaggtg
      301 aggggaagat gtccatgtcc gggttcaagg ccaaaccgaa gttactggcc tctatcttcc
      361 aggagaacca ggagccacag ccgcggctca cgccccaccg caacattaag attacaagtg
      421 gacacctgag tcagcaggac ctggaatccc agatgagaga gcttatctac acgac
      481 tcttgttgtc acccccatta ttgacaatcc aaaggtgcag aaagcactct gacaa   1..41
      541 attgctaatc cagcatttgt ggatagctgc aaactgcgat attgctgatg agcgc   /gene
      601 cgccacattc cacactaacg tgttggtgaa ttcttctggg cattgccagt acctg   /gene
      661 aggcatattc aagagttcct gctacatcga tgtacgctgg tttccctttg atgtg   /infe
      721 ctgcaaactg aagtttgggt cctggtctta cggaggctgg tccttggatc tgcag   /numb
```

او اختيار الاكسون الأخير كما موضح في الفقرة الآتية

```
 661 aggcatattc aagagttcct gctacatcga tgtacgctgg tttccctttg atgtgcagca
 721 ctgcaaactg aagtttgggt cctggtctta cggaggctgg tccttggatc tgcagatgca
 781 ggaggcagat atcagtggct atatccccaa tggagaatgg gacctagtgg gaatcccccgg
 841 caagaggagt gaaaggttct atgagtgctg caaagagccc taccctgatg tcaccttcac
 901 agtgaccatg cgccgcagga cgctctacta tggcctcaac ctgctgatcc cctgtgtgct
 961 catctccgcc ctcgccctgc tggtgttcct gcttcctgca gattccgggg agaagatttc
1021 cctgggggata acagtcttac tctctcttac cgtcttcatg ctgctcgtgg ctgagatcat
1081 gcccgcaaca tccgattcgg taccattgat agcccagtac ttcgccagca ccatgatcat
1141 cgtgggcctc tcggtggtgg tgacggtgat cgtgctgcag taccaccacc acgaccccga
1201 cgggggcaag atgcccaagt ggaccagagt catccttctg aactggtgcg cgtggttcct
1261 gcgaatgaag aggcccgggg aggacaaggt gcgcccggcc tgccagcaca agcagcggcg
1321 ctgcagcctg gccagtgtgg agatgagtgc cgtggcgccg ccgcccgcca gcaacgggaa
1381 cctgctgtac atcggcttcc gcggcctgga cggcgtgcac tgtgtcccga cccccgactc
1441 tggggtagtg tgtggccgca tggcctgctc cccccacgcac gatgagcacc tcctgcacgg
1501 cgggcaaccc cccgaggggg acccggactt ggccaagatc ctggaggagg tccgctacat
1561 tgccaaccgc ttccgctgcc aggacgaaag cgaggcggtc tgcagcgagt ggaagttcgc
1621 cgcctgtgtg gtggaccgcc tgtgcctcat ggccttctcg gtcttcacca tcatc
1681 catcggcatc ctgatgtcgg ctcccaactt cgtggaggcc gtgtccaaag acttt    1223..
1741 accacgcctg gttctgtaca tgtggaaaac tcacagatgg gcaaggcctt tggct    /gene=
1801 agatttgggg gtgctaatcc aggacagcat tacacgccac aactccagtg ttccc    /gene_
1861 gctgtcagtc gtgttgctta cggtttcttt gttactttag gtagtagaat ctcag    /infer
1921 tgtttcatat tctcagatgg gctgatagat atccttggca catccgtacc atcgg    /numbe
```

ولإيجاد البوادىء لهذه القطع من التواليات لابد من تحويلها الى صيغة FASTA أولا ثم نقلها الى البرنامج الموجود في القاعدة " Primer BLAST " وذلك لان استغلال الرابط " Pick primer " سيؤدي الى استعمال توالي الجين الكامل وإيجاد البوادىء له كما في الفقرة أعلاه . والبوادىء المصممة للاكسون الأول في الجين موضح في الشكل الآتي (شكل 97)



شكل 97 : البوادىء الخاصة بالاكسون الأول

وبعض التفاصيل ومواصفات البوادىء موضحة في الفقرة الآتية ومقارنة البوادىء الناجمة مع قاعدة البيانات nr يظهر التأكيد ان البادىء يقع ضمن جزيئات ذات علاقة كما موضح في الفقرة الآتية

```
>NM_148911.1 Homo sapiens CHRNA7 (cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7, exons 5-10) and FAM7A
(family with sequence similarity 7A, exons A-E) fusion (CHRFAM7A), transcript variant 2, mRNA
product length = 80
Forward primer  1    AGGTGAGGGGAAGATGTCCA  20
Template        296  ....................  315

Reverse primer  1    GCTCCTGGTTCTCCTGGAAG  20
Template        375  ....................  356

>NM_139320.1 Homo sapiens CHRNA7 (cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7, exons 5-10) and FAM7A
. (family with sequence similarity 7A, exons A-E) fusion (CHRFAM7A), transcript variant 1, mRNA
product length = 80
Forward primer  1    AGGTGAGGGGAAGATGTCCA  20
Template        296  ....................  315
```

ويمكن استعمال التوالي في برامج أخرى المستعملة بكثرة مثل Primer3 المستقل عن Primer BLAST والبوادىء تظهر في الفقرة الآتية :

```
Primer3 Output

No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO            start  len     tm     gc%   any    3'   seq
LEFT PRIMER        122   19   60.23   57.89  4.00  1.00  acatagctcccgccaagtc
RIGHT  PRIMER      318   20   60.33   50.00  4.00  1.00  acatggacatcttcccctca
SEQUENCE SIZE: 410
INCLUDED REGION SIZE: 410
PRODUCT SIZE: 197, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

  61 acgggagccgcgcctcctgtcggtggagtcggttataaagggagcagccccgcaggccgc

 121 cacatagctcccgccaagtccctcggtgccccttgccattttccagccgcgctcccacgag
      >>>>>>>>>>>>>>>>>>>
 181 ggtcacggcggcggggagaggtggagccgcgagagctcggccgggggccccgcctggtgg

 241 tcgcggccatgacagcggctcgggacaggctccttttccgcgcccctcccgccggaggtg
                                                              <<
 301 aggggaagatgtccatgtccgggttcaaggccaaaccgaagttactggcctctatcttcc
     <<<<<<<<<<<<<<<<<<
 361 aggagaaccaggagccacagccgcggctcacgccccaccgcaacattaag
 KEYS (in order of precedence):
 >>>>>> left primer
 <<<<<< right primer
  بوادي اخرى
1  LEFT   PRIMER   start  len    tm     gc%    any    3'        seq
                    122    19   60.23  57.89  4.00   1.00  acatagctcccaccaagtc
   RIGHT  PRIMER    317    20   60.33  55.00  4.00   0.00  catggacatcttcccctcac
   PRODUCT SIZE: 196, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 1.00


2  LEFT   PRIMER    77     20   59.99  55.00  3.00   2.00  ctgtcggtggagtcggttat
   RIGHT  PRIMER    317    20   60.33  55.00  4.00   0.00  catggacatcttcccctcac
   PRODUCT SIZE: 241, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00
```

ويمكن ملاحظة الفرق (على الأقل في البادىء الأول) بين البرنامجين .

ويمكن استعمال التوالي في برنامج آخر مثل Primer3plus الذي يعطي خمسة من أزاوج البوادىء المقترحة فضلا عن الجوانب الإحصائية المهمة التي اعتمدها البرنامج ، والبوادىء الأساسية موضحة في الشكل 98 الآتي

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

Primer3Manager | Help
About | Source Code

Error: Primer3Plus could not identify File Format

Pair 1:

☑ Left Primer 1: Primer_F

Sequence: ctgtcggtggagtcggttat

Start: 77 Length: 20 bp Tm: 60.0 °C GC: 55.0 % ANY: 3.0 SELF: 2.0

☑ Right Primer 1: Primer_R

Sequence: catggacatcttcccctcac

Start: 317 Length: 20 bp Tm: 60.3 °C GC: 55.0% ANY: 4.0 SELF: 0.0

Product Size: 241 bp Pair Any: 4.0 Pair End: 1.0

```
1    agcccttccc caggcggtag cgggggcagt ggtgctgttg cccttttaaa
51   ctgcggcttg acgggagccg cgcctcctgt cggtggagtc ggttataaag
101  ggagcagccc cgcaggccgc cacatagctc ccgccaagtc ctcggtgccc
151  cttgccattt tccagccgcg ctccccacgag ggtcacggcg gcggggagag
201  gtggagccgc gagagctcgg ccggggggccc cgcctggtgg tcgcggccat
251  gacagcggct cgggacaggc tccttttccg cgcccctccc gccggaggtg
301  aggggaagat gtccatgtcc gggttcaagg ccaaaccgaa gttactggcc
351  tctatcttcc aggagaacca ggagccacag ccgcggctca cgccccaccg
401  caacattaag
```

Pair 2:

☐ Left Primer 2: Primer_1_F

Sequence: ctgtcggtggagtcggttat

Start: 77 Length: 20 bp Tm: 60.0 °C GC: 55.0 % ANY: 3.0 SELF: 2.0

☐ Right Primer 2: Primer_1_R

Sequence: acatggacatcttcccctca

Start: 318 Length: 20 bp Tm: 60.3 °C GC: 50.0 % ANY: 4.0 SELF: 1.0

Product Size: 242 bp Pair Any: 4.0 Pair End: 1.0

شكل 98 : مخرجات البرنامج Primer3plus

وفيها تظهر اغلب المواصفات الخاصة بكل باديء فضلا عن تواليها تاركا للمستخدم اختيار الأفضل والأنسب .

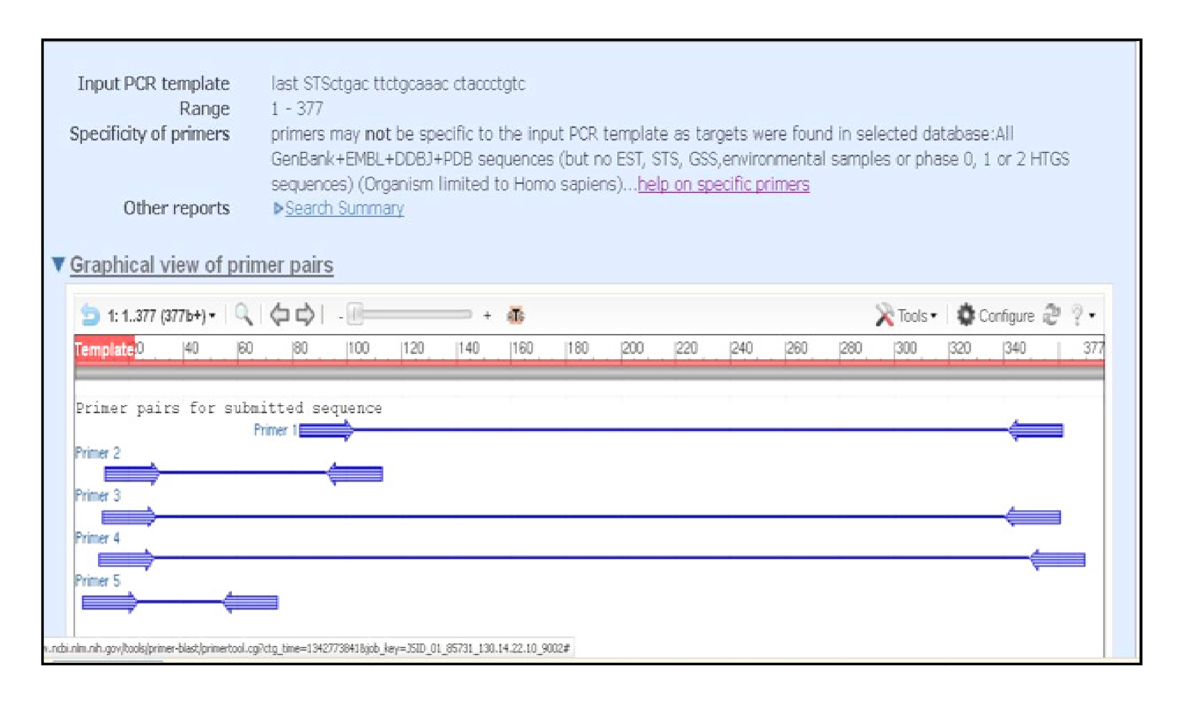
ويمكن استعمال التوالي في برنامج آخر فيما اذ توفرت الشروط اللازمة في كل من البادىء او البرنامج .

وقبل الانتهاء من هذه الفقرة يمكن إضافة ان صيغة بنك الجينات بالإضافة الى توفيرها مواقع الاكسونات في الجين فهي يمكن ان تحدد مواقع STS ، لذلك يمكن استغلالها وعلى غرار الطريقة المستعملة مع الاكسونات يمكن النقر على STS لتظهر تواليتها مظللة كما في الفقرة الآتية

```
1621 cgcctgtgtg gtggaccgcc tgtgcctcat ggccttctcg gtcttcacca tcatctgcac
1681 catcggcatc ctgatgtcgg ctcccaactt cgtggaggcc gtgtccaaag actttgcgta
1741 accacgcctg gttctgtaca tgtggaaaac tcacagatgg gcaaggcctt tggcttggcg
1801 agatttgggg gtgctaatcc aggacagcat tacacgccac aactccagtg ttcccttctg
1861 gctgtcagtc gtgttgctta cggtttcttt gttactttag gtagtagaat ctcagcactt
1921 tgtttcatat tctcagatgg gctgatagat atccttggca catccgtacc atcggtcagc
1981 agggccactg agtagtcatt ttgcccatta gcccactgcc tggaaagccc ttcggagagc
2041 tccccatggc tcctcaccac cgagacagtt ggttttgcat gtctgcatga aggtctacct
2101 gaaaattcaa catttgcttt ttgcttgtgt acaaacccag attgaagcta aaataaacca
2161 gactcactaa atcctttcca ataattgact ggtggaagga aaacaaaaaa caaaa
```

STS الاخير في الجين

وبالطريقة نفسها المتبعة أعلاه يمكن التقاط البوادىء الخاصة بها كما موضح في الشكل 99 .



شكل 99 : البوادي المصممة باستعمال Primer BLAST لآخر STS في الجين المستعمل .

وتظهر مواصفات البوادي بملحق مع التمثيل التصويري .

ومن الجدير بالذكر ان البوادي المدرجة أعلاه كانت تحت مواصفات البرنامج الأصلية Default . ولكن معظم البرامج توفر إمكانيات تغيير المؤشرات وفق رغبة المستخدم او عند عدم ملائمة البادي للعمل لذلك يصار الى تصميم بوادي جديدة وفق المتطلبات التي يريدها المستخدم .

وفي العموم فان البوادي الناتجة لابد ان تخضع لعمليات تقييم بواسطة إجراء عمليات اصطفاف مقابل قواعد البيانات العالمية والتي يكون أفضلها استعمال القاعدة المشذبة nr واستعمال البرنامج BLASTN2.2.6 الذي يمكن الدخول إليه من برنامج BLASTN والذي يحول آنيا الى طريقة البحث عن التواليات القصيرة . اذ ان المفترض ان برنامج الاصطفاف يعمل مع التواليات الطويلة ، ويمكن ان إظهار نتيجة الاصطفاف بشكل مصور فضلا عن ظهور النتائج النصية المرفقة التي تساعد في تقرير فيما إذا كان البادي متخصصا وصالحا للاستعمال بشرح كل خط من خطوط الاصطفاف مع النتائج الإحصائية الخاصة به .

تصـميم بواديء للتواليات المكررة Alu sequences

تقع هذه التواليات في مجموعة اكبر من الجاميع المكررة ، ويتــراوح طــول Alu sequences حــوالي 300 قاعــدة ويوجــد العديــد منـها في الجينــوم البشــري ، ولأهـميتـها في إحــداث التغييرات في الجينوم وارتباط بعضها بالأمراض وضعت لها قواعد بيانات تضـم الأنـواع في الإنسان والأحياء الأخرى (الأحياء حقيقية النواة) مثل قاعدة البيانات TranspoGene التــي ضـمت القاعــدة الســابقة لـها AluGene (transpogene.tau.ac.il) الموضــحة واجهتها في الشكل الآتي (شكل 100)

TranspoGene

The influence of Transposed Elements (TEs) on the transcriptome of 7 species

Select gene, protein or genomic area of interest (at least one of the followings) :

Gene symbol:
Swissprot entry name: (e.g: PPNK_HUMAN) Human and mouse only
Refseq mRNA accession: (e.g: NM_021050)
Refseq protein accession: (e.g: NP_620830)
All TEs located between the selected genomic positions: Select organism | Select chromosome
Strand: both strands | Start: | End:

التعاريف الممكن استعمالها في القاعدة

All organisms: All TEs
Human: All TEs
SINE: All SINE, Alu *, MIR
LINE: All LINE, L1, L2, CR1 (L3)
DNA: All DNA, MER1, MER2, Other DNA
LTR: All LTR, MaLR, ERV1, ERVL, Other LTR
Mouse: All TEs

شكل 100 : واجهة قاعدة البيانات TranspoGene

ويوضح الشكل بعض المحددات للوصول الى تواليات Alu sequences المطلوبة ، واغلبـها تكون ضمن الجينات المشفرة للبروتينات .

ولتصميم بواديء لهذه المكررات اختيرت ثلاث جينات :

الأول : ***PARK2*** الموضح توالي Alu sequence في الآتي :

"gi|360039840|gb|JN392000.1| Homo sapiens PARK2 gene, intron; and SINE AluY, complete sequence

ACTATTATTAAAAAAGAGGCAACTTCGGCCGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGA

GGCCGAGGCGGGCGGATCACGAGGTCAGGAGATCGAGACCATCCTGGCTAACACGGTGAAACCCCGTCTC

TACTAAAAATACAAAAAATTAGCCGGGCGTAGTGGCGGGCGCCTGTAGTCCCAGCTACTCGGGAGGCTGA

GGCAGGAGAATGGCGTGAACCCGGGAGGCGGAGCTTGCAGTGAGCCGAGATCGCGCCACTGCACTCCAGC

CTGGGCGACAGAGCGAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAGGCA

ACTTCATATCCAT

استخدم التوالي في برنامج Primer3 والذي يعطي 4–5 بواديء بكافة البيانات حولها مع الإحصائيات والتعليق عليها والتالي يوضح المخرجات (شكل 101)

Primer3 Output

```
PRIMER PICKING RESULTS FOR gi|360039840|gb|JN392000.1| Homo sapiens PARK2
gene, intron; and SINE AluY, complete sequence
No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO            start  len   tm     gc%    any   3'    seq
LEFT  PRIMER       89    20   59.94  55.00  4.00  2.00  ACGAGGTCAGGAGATCGAGA
RIGHT PRIMER      262    19   59.67  57.89  4.00  2.00  GATCTCGGCTCACTGCAAG

SEQUENCE SIZE: 363
INCLUDED REGION SIZE: 363

PRODUCT SIZE: 174, PAIR ANY COMPL: 6.00, PAIR 3' COMPL: 3.00
    1 ACTATTATTAAAAAAGAGGCAACTTCGGCCGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAG

   61 CACTTTGGGAGGCCGAGGCGGGCGGATCACGAGGTCAGGAGATCGAGACCATCCTGGCTA
                                  >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
  121 ACACGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAAATTAGCCGGGCGTAGTGGCGGGC

  181 GCCTGTAGTCCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATGGCGTGAACCCGGGAGGCG

  241 GAGCTTGCAGTGAGCCGAGATCGCGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGCGAGACT
         <<<<<<<<<<<<<<<<<<<
  301 CCGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAGGCAACTTCATATC
  361 CAT
 KEYS (in order of precedence):
 >>>>>> left primer
 <<<<<< right primer
```

بوادي اضافية

		start	len	tm	gc%	any	3'	seq
1	LEFT PRIMER	47	20	59.20	50.00	4.00	0.00	GCCTGTAATCCCAGCACTTT
	RIGHT PRIMER	262	19	59.67	57.89	4.00	2.00	GATCTCGGCTCACTGCAAG
	PRODUCT SIZE: 216, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 2.00							
2	LEFT PRIMER	106	20	60.13	55.00	3.00	2.00	AGACCATCCTGGCTAACACG
	RIGHT PRIMER	304	19	61.75	63.16	5.00	2.00	ACGGAGTCTCGCTCTGTCG
	PRODUCT SIZE: 199, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 2.00							

شكل 101 : مخرجات البرنامج Primer3

والشكل التالي (شكل 102) توضح البواديء الناجّة من استعمال البرنامج Primer3Plus الذي يظهر عددا من البواديء (خمسة في العادة) بتواليها ومواصفاتها والقيم الإحصائية الخاصة بها

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

Primer3Plus loaded Fasta-File

Pair 1:

☑ Left Primer 1: gi|360039840|gb|JN392000.1| Homo sapier

Sequence: ACGAGGTCAGGAGATCGAGA

Start: 89 Length: 20 bp Tm: 59.9 °C GC: 55.0 % ANY: 4.0 SELF: 2.0

☑ Right Primer 1: gi|360039840|gb|JN392000.1| Homo sapier

Sequence: GATCTCGGCTCACTGCAAG

Start: 262 Length: 19 bp Tm: 59.7 °C GC: 57.9 % ANY: 4.0 SELF: 2.0

Product Size: 174 bp Pair Any: 6.0 Pair End: 3.0

```
1     ACTATTATTA AAAAAGAGGC AACTTCGGCC GGGCGCGGTG GCTCACGCCT
51    GTAATCCCAG CACTTTGGGA GGCCGAGGCG GGCGGATCAC GAGGTCAGGA
101   GATCGAGACC ATCCTGGCTA ACACGGTGAA ACCCCGTCTC TACTAAAAAT
151   ACAAAAAATT AGCCGGGCGT AGTGGCGGGC GCCTGTAGTC CCAGCTACTC
201   GGGAGGCTGA GGCAGGAGAA TGGCGTGAAC CCGGGAGGCG GAGCTTGCAG
251   TGAGCCGAGA TCGCGCCACT GCACTCCAGC CTGGGCGACA GAGCGAGACT
301   CCGTCTCAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAGAGGCA
351   ACTTCATATC CAT
```

Pair 2:

☐ Left Primer 2: gi|360039840|gb|JN392000.1| Homo sapier

Sequence: AGACCATCCTGGCTAACACG

Start: 106 Length: 20 bp Tm: 60.1 °C GC: 55.0 % ANY: 3.0 SELF : 2.0

☐ Right Primer 2: gi|360039840|gb|JN392000.1| Homo sapier

Sequence: GATCTCGGCTCACTGCAAG

Start: 262 Length: 19 bp Tm: 59.7 °C GC: 57.9 % ANY: 4.0 SELF : 2.0

Product Size: 157 bp Pair Any: 3.0 Pair End: 1.0

شكل 102 : مخرجات البرنامج Primer3Plus

أما المثال **الثاني** فهو خاص بتواليات Alu sequence الخاصة بالجين ***WDR64*** البشري

```
>gi|360039838|gb|JN391998.1| Homo sapiens WDR64 gene, intron; and SINE AluYa5, complete sequence

ACAACAGCACGTGAAATAAAATCATGAGGCCGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGG

AGGCCGAGGCGGGCGGATCACGAGGTCAGGAGATCGAGACCATCCCGGCTAAAACGGTGAAACCCCGTCT

CTACTAAAAATACAAAAAATTAGCCGGGCGTAGTGGCGGGCGCCTGTAGTCCCAGCTACTTGGGAGGCTG

AGGCAGGAGAATGGCGTGAACCCGGGAGGTGGAGCTTGCAGTGAGCCGAGATCCCGCCACTGCACTCCAG

CCTGGGCGACAGAGCGAGACTCTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACGACGA
```

وعلى غرار الطريقة أعلاه استعمل التوالي لإيجاد البوادىء باستعمال البرنامج Primer3

Primer3 Output

```
PRIMER PICKING RESULTS FOR gi|360039838|gb|JN391998.1| Homo sapiens WDR64
gene, intron; and SINE AluYa5, complete sequence
Using mispriming library humrep_and_simple.txt
Using 1-based sequence positions
OLIGO            start  len  tm     gc%    any   3'    rep    seq
LEFT  PRIMER       2     23  60.05  34.78  6.00  3.00  12.00  CAACAGCACGTGAAATAAAATCA

RIGHT  PRIMER    137     18  59.37  50.00  3.00  2.00  12.00  CGGGGTTTCACCGTTTTA
SEQUENCE SIZE: 349
INCLUDED REGION SIZE: 349
PRODUCT SIZE: 136, PAIR ANY COMPL: 6.00, PAIR 3' COMPL: 3.00

   1 ACAACAGCACGTGAAATAAAATCATGAGGCCGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCA
      >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
  61 GCACTTTGGGAGGCCGAGGCGGGCGGATCACGAGGTCAGGAGATCGAGACCATCCCGGCT
                                                               <
 121 AAAACGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAAATTAGCCGGGCGTAGTGGCGGG
     <<<<<<<<<<<<<<<<<
 181 CGCCTGTAGTCCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATGGCGTGAACCCGGGAGGT

 241 GGAGCTTGCAGTGAGCCGAGATCCCGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGCGAGAC

 301 TCTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACGACGA
 KEYS (in order of precedence):
 >>>>>> left primer
 <<<<<< right primer
```

بوادىء اضافية

```
 1 LEFT  PRIMER     start  len  tm     gc%    any   3'    rep    seq
                      2     23  60.05  34.78  6.00  3.00  12.00  CAACAGCACGTGAAATAAAATCA

   RIGHT  PRIMER    128     18  60.85  55.56  4.00  1.00  12.00  ACCGTTTTAGCCGGGATG
 PRODUCT SIZE: 127, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 2.00
```

شكل 103 : مخرجات البرنامج Primer3

اما البواديء الناتجة من استعمال البرنامج Primer3plus فموضحة في الفقرة الآتية :

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

Primer3Plus loaded Fasta-File

Pair 1:

☑ Left Primer 1: gi|360039838|gb|JN391998.1| Homo sapier

Sequence: ACGAGGTCAGGAGATCGAGA

Start:90 Length: 20 bp Tm: 59.9 °C GC: 55.0 % ANY: 4.0

☑ Right Primer 1: gi|360039838|gb|JN391998.1| Homo sapier

Sequence: GATCTCGGCTCACTGCAAG

Start: 263 Length: 19 bp Tm: 59.7 °C GC: 57.9 % ANY: 4.0

Product Size: 174 bp Pair Any: 6.0 Pair End: 3.0

```
1      ACAACAGCAC GTGAAATAAA ATCATGAGGC CGGGCGCGGT GGCTCACGCC
51     TGTAATCCCA GCACTTTGGG AGGCCGAGGC GGGCGGATCA CGAGGTCAGG
101    AGATCGAGAC CATCCCGGCT AAAACGGTGA AACCCCGTCT CTACTAAAAA
151    TACAAAAAAT TAGCCGGGCG TAGTGGCGGG CGCCTGTAGT CCCAGCTACT
201    TGGGAGGCTG AGGCAGGAGA ATGGCGTGAA CCCGGGAGGT GGAGCTTGCA
251    GTGAGCCGAG ATCCCGCCAC TGCACTCCAG CCTGGGCGAC AGAGCGAGAC
301    TCTGTCTCAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAACGACGA
```

Pair 2:

☐ Left Primer 2: gi|360039838|gb|JN391998.1| Homo sapier

Sequence: ACGAGGTCAGGAGATCGAGA

Start: 90 Length: 20 bp Tm: 59.9 °C GC: 55.0 % ANY: 4.0

☐ Right Primer 2: gi|360039838|gb|JN391998.1| Homo sapier

Sequence: CTCACTGCAAGCTCCACCT

Start: 255 Length: 19 bp Tm: 59.1 °C GC: 57.9 % ANY: 4.0

Product Size: 166 bp Pair Any: 4.0 Pair End: 3.0

شكل 104 : مخرجات البرنامج Primer3Plus

والمثــال **الثالــث** خــاص بــالجين ***TCBA1*** في الإنســان وتــوالي Alu sequence مــوضــحة في الـفـقـرة الآتية

```
"gi|360039839|gb|JN391999.1| Homo sapiens TCBA1 gene, intron; and SINE AluYa4, partial sequence

TCTTTGCAAGATGGAGGAGAAGGGCCGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCC

GAGGCGGGCGGATCACGAGGTCAGGAGATCGAGACCATCCCGGCTAAAACGGTGAAACCCCGTCTCTACT

AAAAATACAAAAAATTAGCCGGGCGTAGTGGCGGGCGCCTGTAGTCCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCA

GGAGAATGGCGTGAACCCGGGAGGCGGAGCTTGCAGTGAGCCGAGATTGCGCCACTGCACTCCAGCCTGG

GCGACAGAGCGAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

وباسـتـعـمـال بـرنـامـج Primer3 كـانـت الـبـواديء الـمـصـمـمـة مـوضـحـة في الآتي :

```
Primer3 Output
PRIMER PICKING RESULTS FOR gi|360039839|gb|JN391999.1| Homo sapiens TCBA1
gene, intron; and SINE AluYa4, partial sequence
Using mispriming library humrep_and_simple.txt
Using 1-based sequence positions
OLIGO            start  len   tm     gc%    any   3'    rep    seq
LEFT  PRIMER       4     20   60.33  50.00  6.00  0.00  12.00  TTGCAAGATGGAGGAGAAGG
RIGHT  PRIMER    132     18   59.37  50.00  3.00  2.00  12.00  CGGGGTTTCACCGTTTTA
 SEQUENCE SIZE: 329
 INCLUDED REGION SIZE: 329
 PRODUCT SIZE: 129, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

  1 TCTTTGCAAGATGGAGGAGAAGGGCCGGGCGCGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACT
       >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
 61 TTGGGAGGCCGAGGCGGGCGGATCACGAGGTCAGGAGATCGAGACCATCCCGGCTAAAAC
                                                          <<<<<<
121 GGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAAATTAGCCGGGCGTAGTGGCGGGCGCCT
    <<<<<<<<<<<<
181 GTAGTCCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATGGCGTGAACCCGGGAGGCGGAGC

241 TTGCAGTGAGCCGAGATTGCGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGCGAGACTCCGT

301 CTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
KEYS (in order of precedence):
>>>>>> left primer
<<<<<< right primer
  بوادي ء اضافية

1  LEFT  PRIMER  start  len   tm     gc%    any   3'    rep    seq
                   1     21   59.94  42.86  6.00  0.00  12.00  TCTTTGCAAGATGGAGGAGAA

 RIGHT  PRIMER   132     18   59.37  50.00  3.00  2.00  12.00  CGGGGTTTCACCGTTTTA

 PRODUCT SIZE: 132, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

 2  LEFT  PRIMER   4     20   60.33  50.00  6.00  0.00  12.00  TTGCAAGATGGAGGAGAAGG
    RIGHT  PRIMER 123    18   60.85  55.56  4.00  1.00  12.00  ACCGTTTTAGCCGGGATG

    PRODUCT SIZE: 120, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 0.00
```

شـكـل 105 : مخـرجـات الـبرنـامـج Primer3

وباسـتعـمـال الـبرنامـج Primer3plus فـبعـض الـبواديء الـناجّة مـوضـحـة في الـفـقـرة الآتـيـة

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

Pair 1:

☑ Left Primer 1: gi|360039839|gb|JN391999.1| Homo sapier

Sequence: TTGCAAGATGGAGGAGAAGG

Start: 4 Length: 20 bp Tm: 60.3 °C GC: 50.0 % ANY: 6.0 SELF: 0.0

☑ Right Primer 1: gi|360039839|gb|JN391999.1| Homo sapier

Sequence: ACTACGCCCGGCTAATTTTT

Start: 169 Length: 20 bp Tm: 60.0 °C GC: 45.0 % ANY: 5.0 SELF: 1.0

Product Size: 166 bp Pair Any: 3.0 Pair End: 0.0

```
1     TCTTTGCAAG ATGGAGGAGA AGGGCCGGGC GCGGTGGCTC ACGCCTGTAA
51    TCCCAGCACT TTGGGAGGCC GAGGCGGGCG GATCACGAGG TCAGGAGATC
101   GAGACCATCC CGGCTAAAAC GGTGAAACCC CGTCTCTACT AAAAATACAA
151   AAAATTAGCC GGGCGTAGTG GCGGGCGCCT GTAGTCCCAG CTACTTGGGA
201   GGCTGAGGCA GGAGAATGGC GTGAACCCGG GAGGCGGAGC TTGCAGTGAG
251   CCGAGATTGC GCCACTGCAC TCCAGCCTGG GCGACAGAGC GAGACTCCGT
301   CTCAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAA
```

Pair 2:

☐ Left Primer 2: gi|360039839|gb|JN391999.1| Homo sapier

Sequence: TCTTTGCAAGATGGAGGAGAA

Start: 1 Length: 21 bp Tm: 59.9 °C GC: 42.9 % ANY: 6.0 SELF: 0.0

☐ Right Primer 2: gi|360039839|gb|JN391999.1| Homo sapier

Sequence: ACTACGCCCGGCTAATTTTT

Start: 169 Length: 20 bp Tm: 60.0 °C GC: 45.0 % ANY: 5.0 SELF: 1.0

Product Size: 169 bp Pair Any: 3.0 Pair End: 2.0

Pair 3:

☐ Left Primer 3: gi|360039839|gb|JN391999.1| Homo sapier

Sequence: TTGCAAGATGGAGGAGAAGG

Start: 4 Length: 20 bp Tm: 60.3 °C GC: 50.0 % ANY: 6.0 SELF: 0.0

شـكـل106: مـخـرجـات الـبرنامـج Primer3Plus

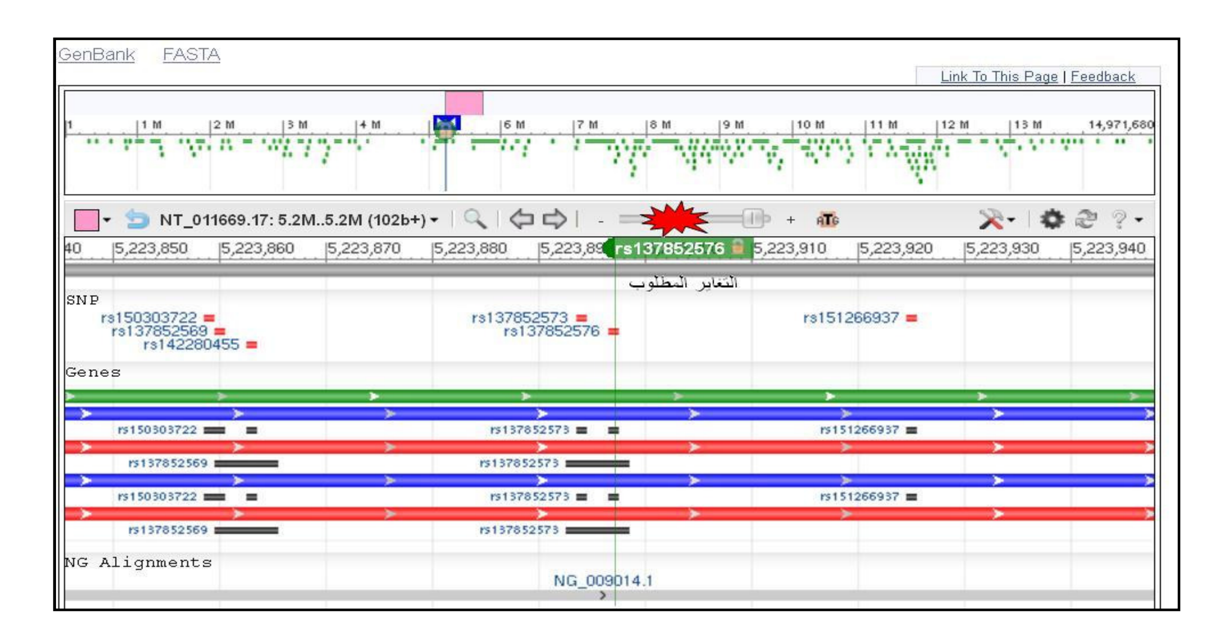
إيجاد البوادىء لتغايرات النيوكلوتيد المفرد SNP

نظرا لكثرة وأهمية هذه التغايرات فقد صنفت وتم تحديد العديد من البيانات حولها وجمعت ووحدت في قاعدة بيانات خاصة بها dbSNP في الموقع العالم NCBI ، وأعطيت أرقام تعريفية IDs او مداخل Entries تبدأ بـ rs او ss (ولكل منها رمز لشيء خاص) والأولى أكثر استعمالا . وبعد اختيار SNP من الواجهة الرئيسة (Home Page) لموقع NCBI تظهر النافذة الخاصة بـ dbSNP ، ويتم تسجيل المرض او الحالة التي من المحتمل انها ترتبط لواحد او مجموعة من التغايرات SNPs مثل rs 137852576 وتظهر كما موضح في الشكل الآتي (شكل 107)



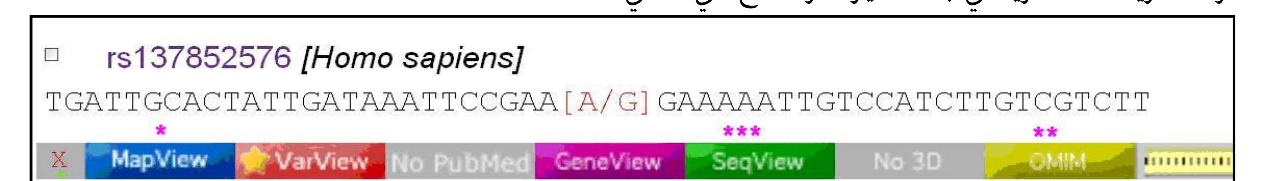
شكل 107 : عرض للـ SNPs في قاعدة البيانات dbSNP

والنقر على الرقم التعريفي تظهر البيانات الخاصة بالتغاير كما موضح في الشكل الآتي (108)



شكل 108 : موقع التغاير المنتخب rs 137852576 ويظهر بلون مفعل

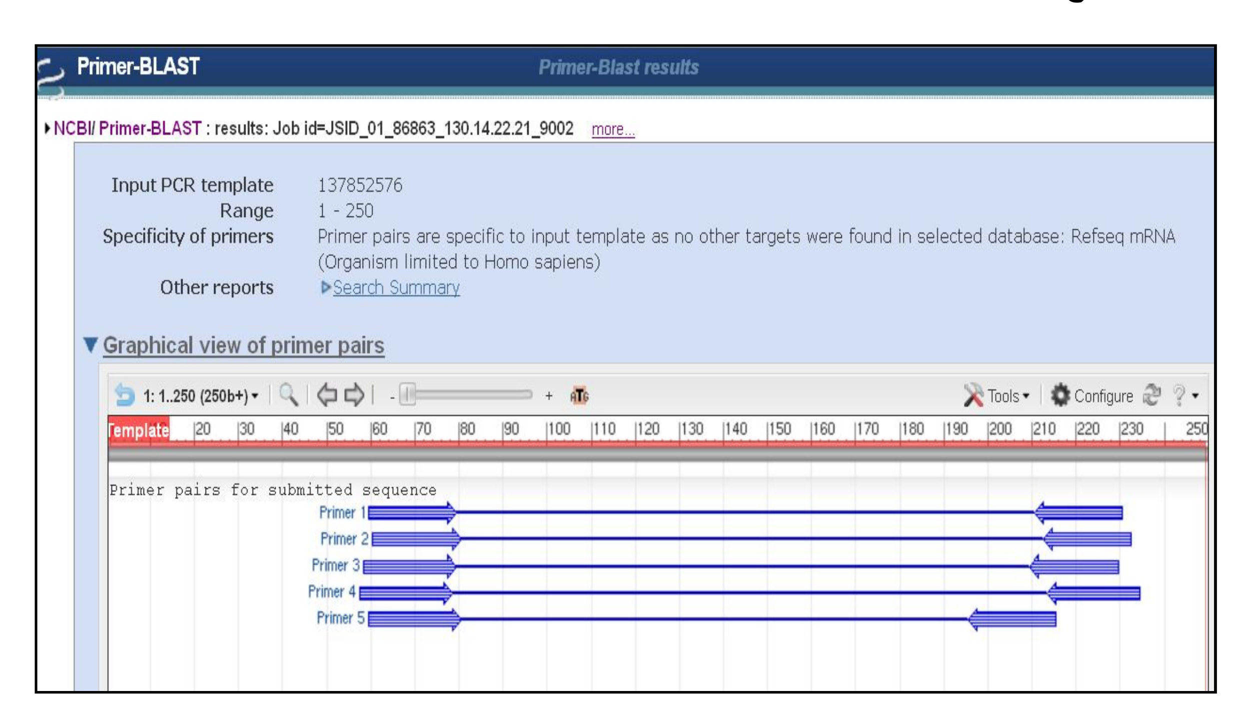
ويظهر التوالي الخاص بالمنطقة التي يوجد فيها التغاير وهو الهدف المطلوب لتحديد البوادىء كما في الشكل أعلاه والفقرة الملحقة به .
والشريط التعريفي بالتغاير الموضح في الآتي



شكل 84 : الشريط المساعد للبحث عن المعلومات الخاصة بـــ SNP المنتخب

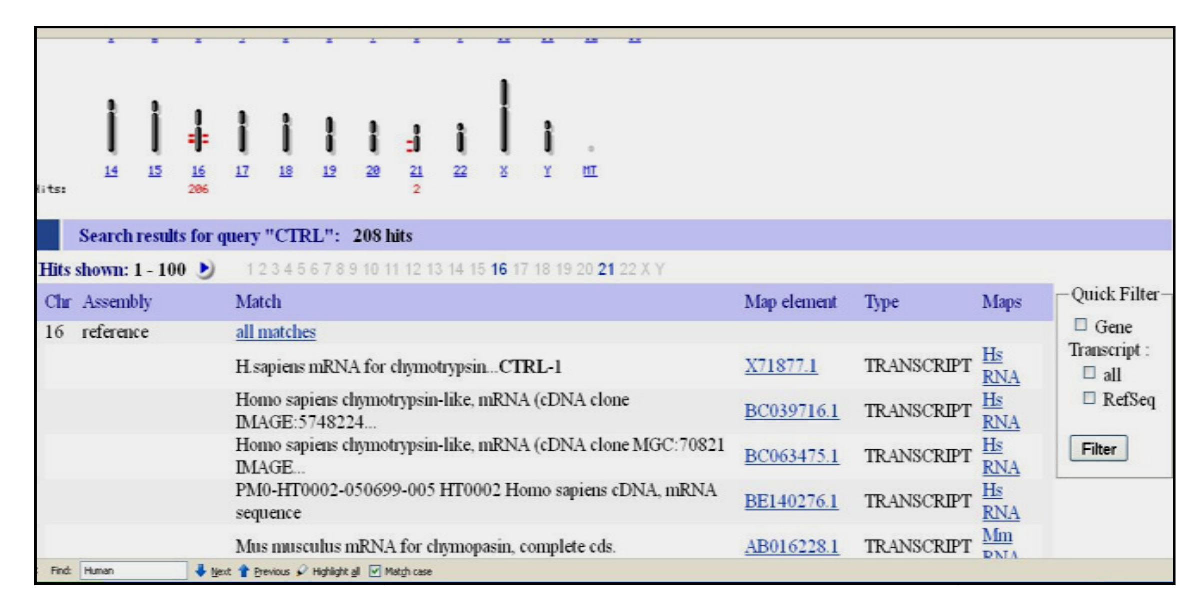
وفي الشريط بعض الإمكانيات . فالمقطع الأول MapVivew * عند النقر عليه يظهر موقع التغاير على الكروموسوم . ويمكن ايضا من استعمال الشريط إظهار التركيب المجسم للبروتينات ان توفرت في القاعدة باستعمال الإيقونة 3D وقد يكون هذا مباشرا او استعمال بعض البرامج او الوسائل الموجودة ضمن موقع NCBI . والمهم ان شريط المهام هذا يربط الى قاعدة OMIM ** للتحري عن الأمراض الوراثية . ولكن المهم في موضوع المناقشة الحالي هو الحصول على توالي النيوكليوتيدات وهذا يمكن الوصول اليه من إيقونة SeqView *** وعند النقر عليها يظهر التغاير المطلوب وهو مثلا rs137852576 والمناطق المجاورة وتكون القطعة مفعلة كما في الشكل أعلاه

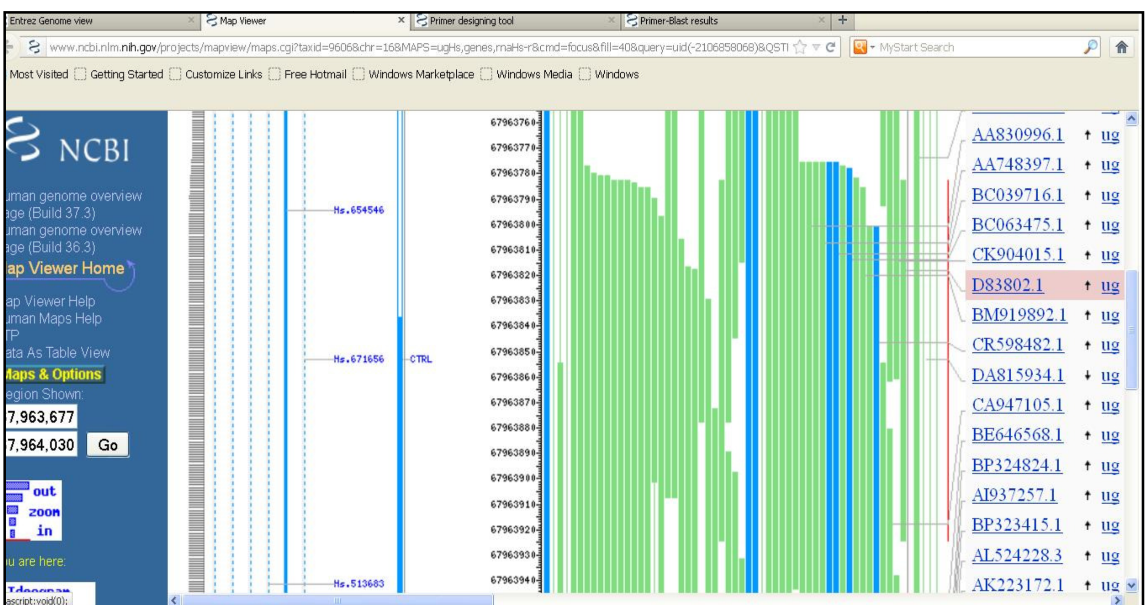
وبظهور هذه الواجهة تظهر إمكانيات الحصول على التواليات بصيغة GenBank او FASTA . وفي الواجهة تظهر الإمكانيات المعتادة مع التواليات وهي BLAST وكذلك الحصول على البواديء Pick primer وبتطبيق فقرة الحصول على البواديء يمكن الحصول على النتائج الآتية (شكل109)



شكل 109 : البواديء المصممة للـــ SNP باستعمال برنامج Primer BLAST

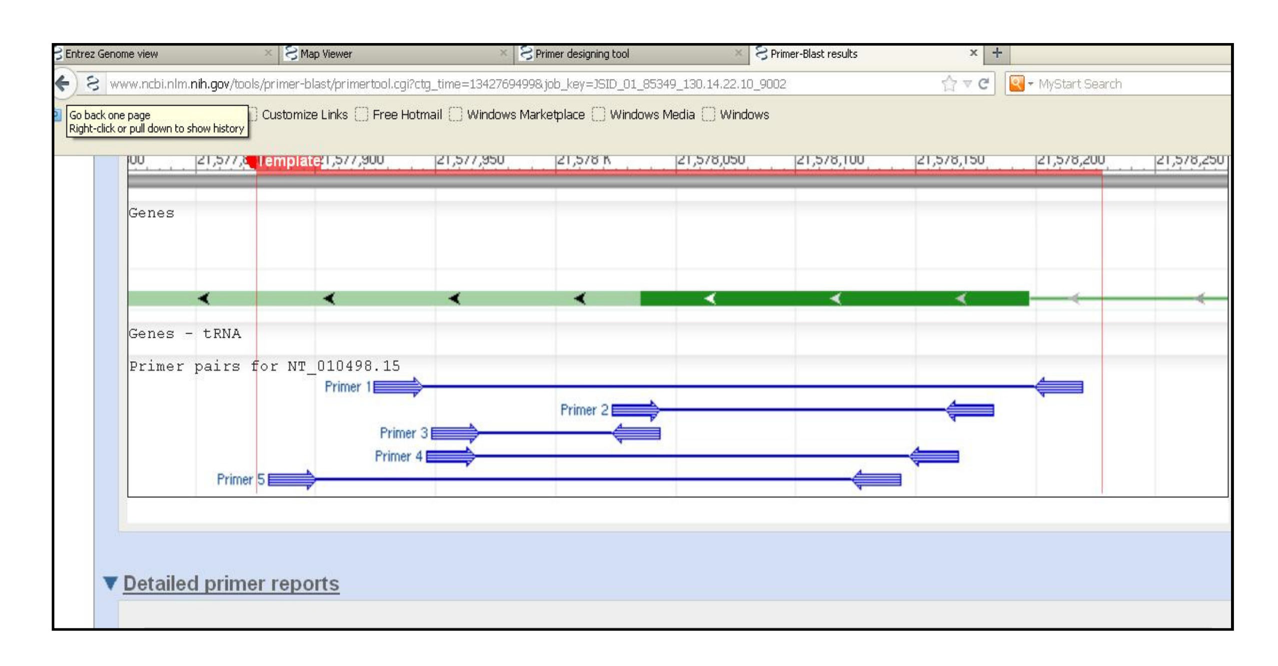
وفي حالة عدم معرفة الرقم التعريفي (rs ID) للتغاير ولكن وجود ما يعرف التغاير مثل CTRL التغاير الخاص بحدوث التليف الحوصلي Cystic fibrosis . فيمكن إدخالها في نافذة البحث في dbSNP ككلمة مفتاحية . او من استعمال MapView الموجودة في الصفحة الرئيسة لموقع NCBI ليظهر التغاير بأرقام تعريفية خاصة بها في الموقع كما في الشكل (شكل 110)





شكل 110 : موقع SNP الخاصة بالتليف الحوصلي Cystic fibrosis

وبالمعالجة والتنقل بين الصفحات يمكن الوصول الى التوالي او التواليات لهذا التغاير والكروموسومات التي يوجد فيه ومن ثم إمكانية ظهور (BLAST و Pick primer) للحصول على البواديء الخاصة لها كما في الشكل الآتي (شكل 111) :



شكل 111 : البوادئ المصممة من استعمال Primer BLAST الخاصة بالتليف الحوصلي Cystic fibrosis

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGACCCTCAACAGCCTCTTC	Plus	20	21577925	21577944	60.04	60.00	5.00	3.00
Reverse primer	CTCCCTCCCTCTTCCCTCTC	Minus	20	21578219	21578200	60.11	65.00	0.00	0.00
Internal oligo		Plus							
Product length	295								
Product Tm									
Product Tm - min(OLIGO Tm)									
Exon junction									
Total intron size									

Products on intended target

Products on allowed transcript variants

Products on potentially unintended templates

>AC040162.5 Homo sapiens chromosome 16 clone CTC-479C5, complete sequence

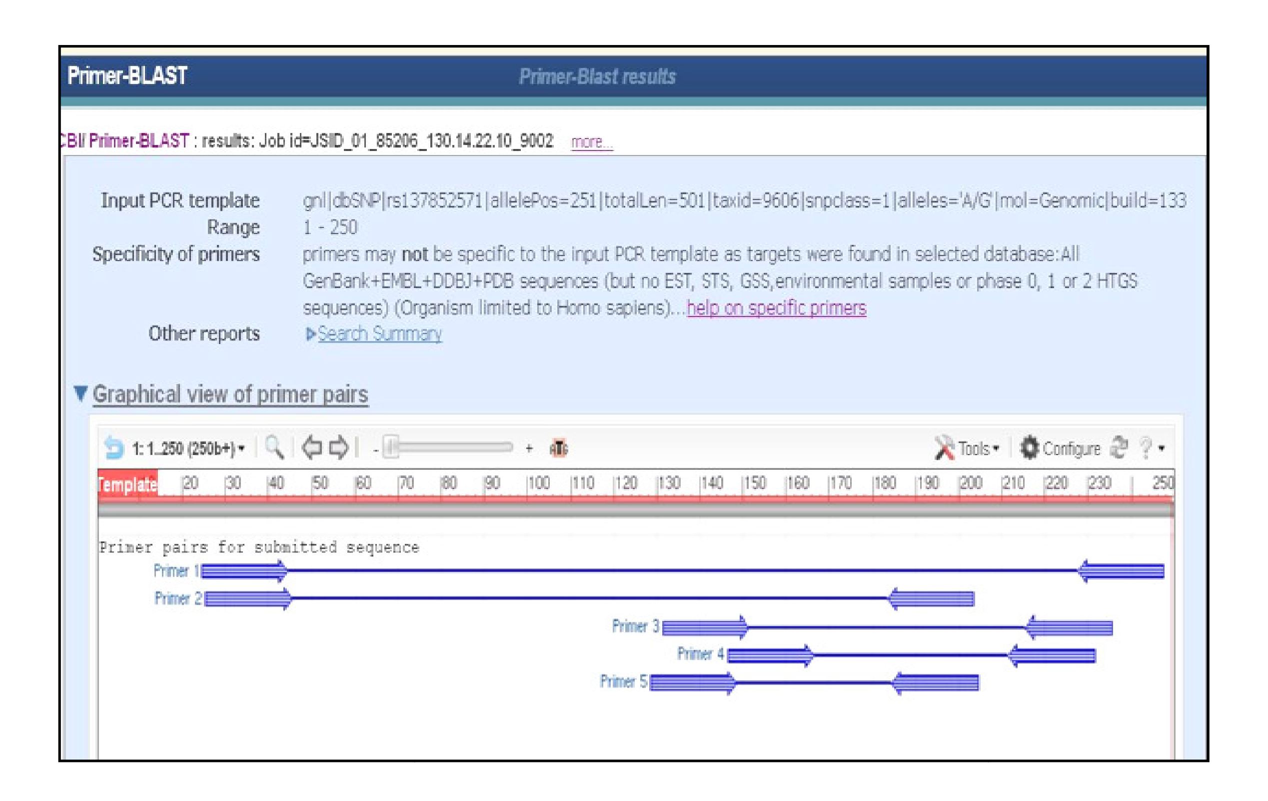
```
product length = 295
Forward primer  1      GGACCCTCAACAGCCTCTTC  20
Template        86054  ....................  86035

Reverse primer  1      CTCCCTCCCTCTTCCCTCTC  20
Template        85760  ....................  85779

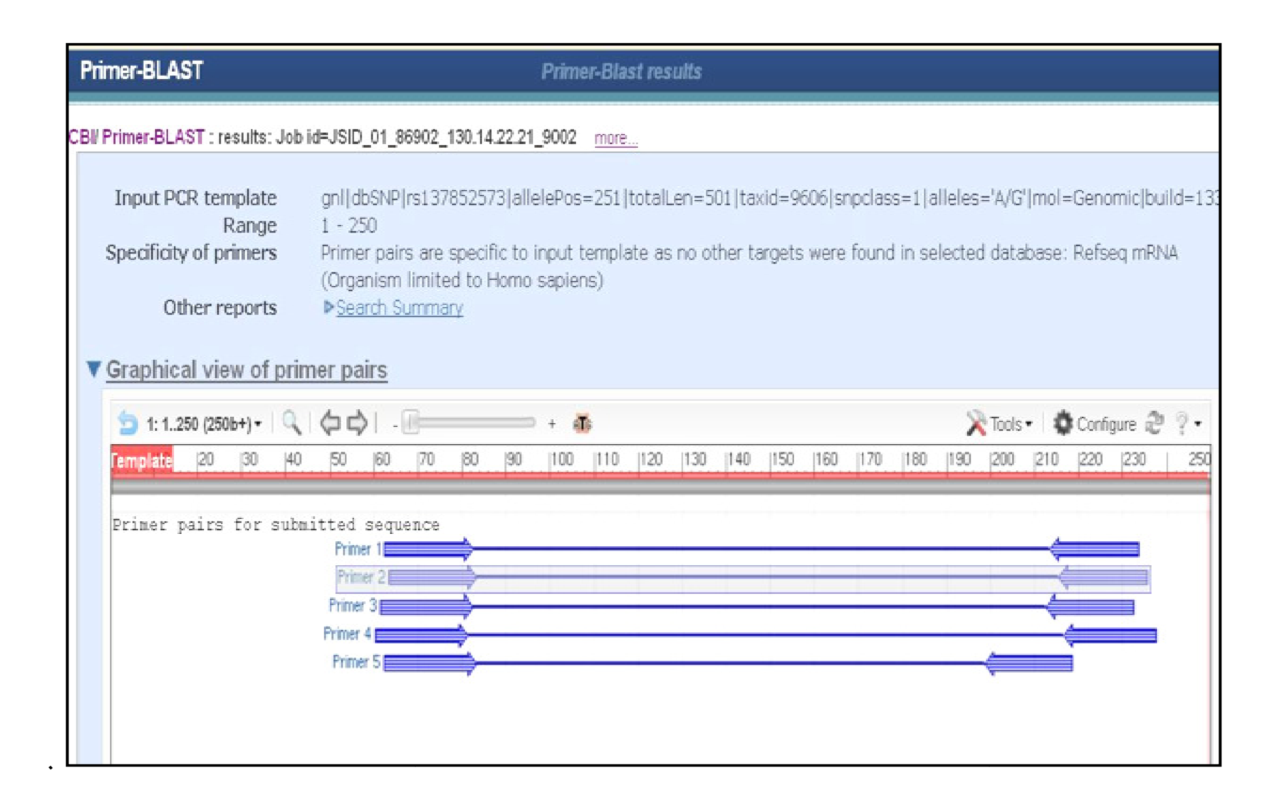

product length = 4271
Reverse primer  1      CTCCCTCCCTCTTCCCTCTC  20
Template        90030  ......G....A.......G  90011

Reverse primer  1      CTCCCTCCCTCTTCCCTCTC  20
```

وقد استعملت الطريقة لإيجاد SNPs أخرى مثل rs137852571 و rs137852573 وكما موضح في الآتي :



شكل 112 : البوادىء المصممة باستعمال Primer BLAST الخاصة بالتغايرات rs137852571



شكل 113 : البوادىء المصممة باستعمال Primer BLAST الخاصة بالتغايرات rs137852573 .

إيجاد البواديء الخاصة ببعض الجينات البكترية

تمتاز الجينات البكترية بكونها ذات تغايرات كبيرة وليس كما هو الحال في الأحياء حقيقية النواة خاصة الراقية منها التي تمتاز بالثبوت الى درجة ما . ولذلك عند الشروع بتصميم بواديء لجين معين فيجب الأخذ بنظر الاعتبار الفروق بين السلالات وعندها يفضل ان يصمم الباديء للمناطق الثابتة او التي يطلق عليها Backbone والابتعاد عن المناطق المتغايرة Loops وهنا تضاف بعض الخطوات الأولية قبل البدء بتصميم البواديء وهو إيجاد المناطق الثابتة من الجين ، لتكون نواة للقطع المضخمة ، وتلاؤم أي من السلالات الجديدة او التي لم يسبر غورها سابقا ، ويمكن تحديد تصميم هذه البواديء في هذه الحالة بالخطوات الآتية :

أولا : تحديد الجين المطلوب وتحديد رمزه وإيجاد تواليه في اكبر عدد ممكن من السلالات ، ففي البكتريا المرضية يمكن الاستعانة بقاعدة عوامل الضراوة VFDB (www.mgc.ac.cn/VFs/) او غيرها وجمعها في ملف Notepad او أي شكل آخر من الملفات التي تتعامل معها البرامج والأخير هو الأفضل .

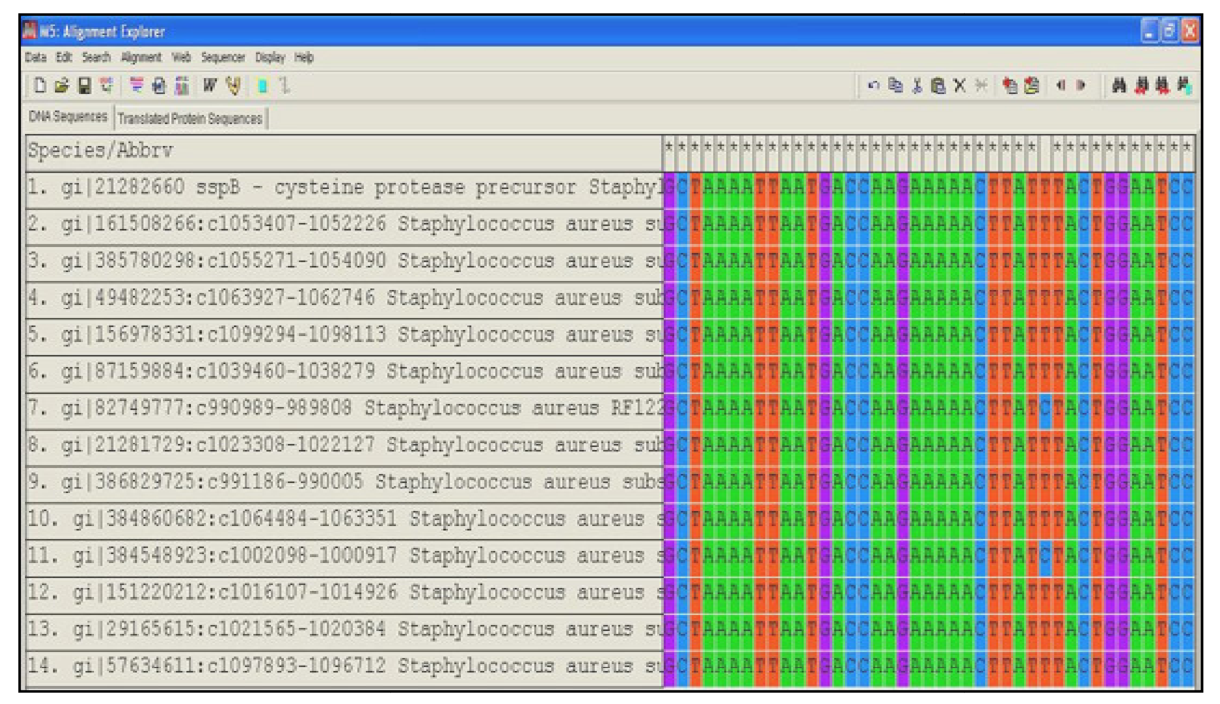
ثانيا : إجراء عمليات الاصطفاف Aligning باستعمال البرامج التي يوجد منها العديد مثل مجموعة Clustal وهذه قد تكون مستقلة او ضمن برامج أخرى مثل برنامج Mega الذي يمكن تحميله من مواقع خاصة تحدد من قبل المسئولين عن البرنامج وترسل بطلب خاص بالبريد الالكتروني ، او من إصدارات Clustal الكثيرة التي يمكن ان توجد ضمن مواقع خاصة مثل الموقع الخاص بالاتحاد الأوربي EMBL (http://www.embl.de) .

ثالثا : بعد إجراء الاصطفاف يتم تشذيب مخرجات الاصطفاف مثل حذف الفجوات Gaps التي تظهر على شكل (-) في المخرجات ولذلك لان معظم البرامج الخاصة بتصميم البواديء لا تعمل بوجود هذه الفجوات ، وكذلك يمكن ان يتم حذف تواليات بعض السلالات اذا كانت تؤثر في نواتج الاصطفاف .

رابعا : يتم اختيار المناطق المشتركة من التواليات في السلالات المختلفة والتي تعلم بـــ (*) في بعض البرامج ، ويتم لصقها في ملف Notepad جديد ويعرف باسم معين (ويجب ان تكون التسمية باللغة الانكليزية لان البرامج في العادة مكتوبة باللغة الانكليزية لذلك تنقطع سلسلة خطوات البرنامج عند وجود إشارات لا يتعرف عليها) .

خامسا : يستعمل التوالي في برامج تصميم البوادىء العامة سواء كانت ضمن NCBI او غيره من البرامج .

وكمثال لما ذكر أعلاه تم اختيار الجين Staphopain ورمزه (sspB) الخاص بجين Cysteine protease من سلالات معينة ، أدخلت التواليات برنامج Mega لعمل اصطفاف لها . أشارت مخرجات البرنامج الى وجود الفجوات وشذوذ بعض السلالات ، لذلك تم حذف تواليات بعض السلالات وبعض الفجوات للحصول على توالي قابل للاستعمال في برامج تصميم البوادىء وكان طوله 521 قاعدة ، ويجب ان يكون التوالي الثابت المراد استعماله أكثر من 300 قاعدة كي يتمكن أي برنامج من إجراء الحسابات اللازمة ، وهذه العملية موضحة في الشكل 114 :



شكل 114 : التواليات الثابتة المنتخبة من الجين المنتخب المصطفة باستعمال برنامج Mega التي استخدمت في تصميم البوادىء

ومنها يمكن الحصول على المناطق الأكثر ثبوتا وبالتشذيب وإزالة الفجوات وتواليات السلالات الشاذة يمكن الحصول على التوالي التالي وكتابته بصيغة FASTA :

>Align sequence

```
AAGTTCAATATGAAAATACATTAAAAAACTTCAAAATTAGAGAACAACAATTCGATAACTCATGGTGTGCAGGATTTAGTATGGCAGCATTATTAAATGCA
ACTAAAAATACAGACACTTATAATGCACATGATATTATGCGTACATTATACCCTGAAGTAAGTGAGCAAGACCTTCCTAATTGCTCAACATTCCCTAATCAA
ATGATTGAATACGGTAAATCACAAGGCAGAGATATTCATTATCAAGAAGGCGTACCATCATATGAACAAGTTGATCAACTTACAAAAGATAATGTAGGAA
TTATGATTCTTGCACAAAGTGTATCTCAAAACCCTAATGATCCACATTTAGGACATGCCCTAGCAGTTGTTGGTAATGCTAAAATTAATGACCAAGAAAAAC
TTATTTACTGGAATCCTTGGGATACAGAATTATCAATCCAAGATGCAGATTCAAGCCTATTACATTTATCATTCAATCGTGATTATAACTGGTATGGTTCAAT
GATAGGTTACTAA
```

أدخلت التواليات المصطفة Aligned sequence الى برنامج Primer BLAST والذي أعطى بوادي، موضحة في الشكل 115 :

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGACATGCCCTAGCAGTTGT	Plus	20	354	373	60.04	55.00	6.00	2.00
Reverse primer	AGGCTTGAATCTGCATCTTGGA	Minus	22	463	442	60.03	45.45	4.00	2.00
Product length	110								

Products on potentially unintended templates

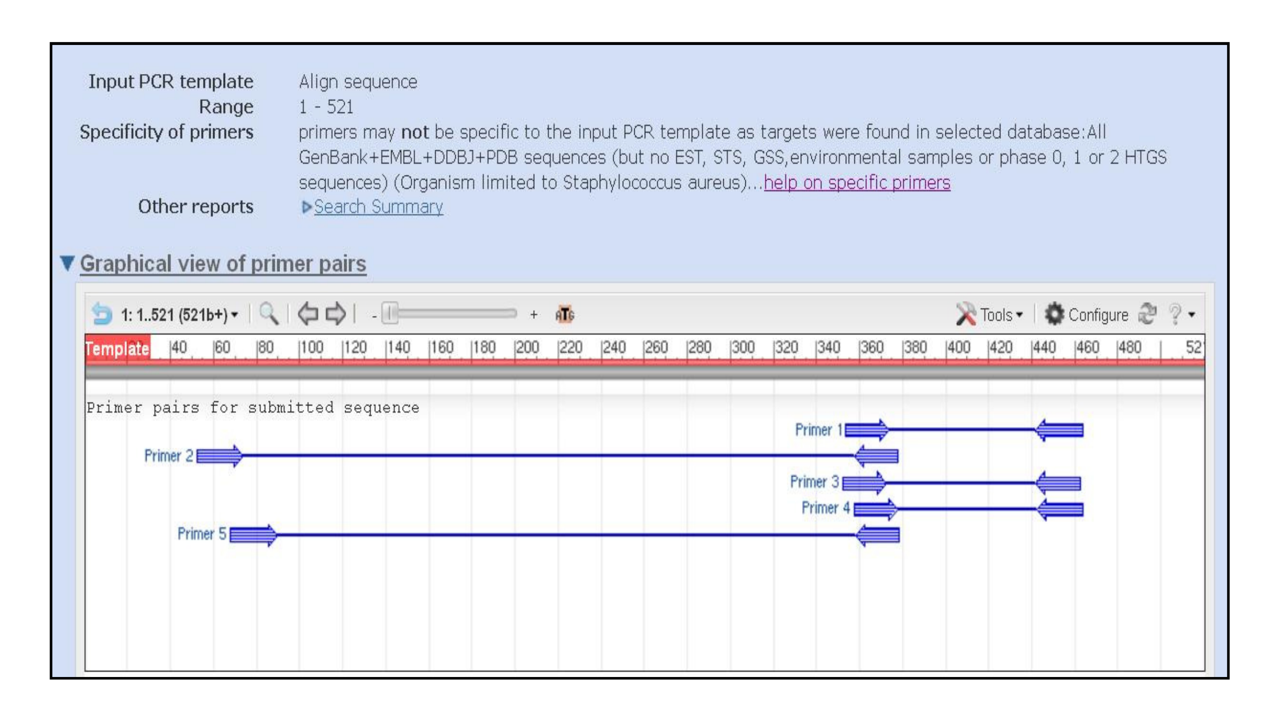
>FR714927.1 Staphylococcus aureus subsp. aureus ECT-R 2 complete genome

```
product length = 110
Features associated with this product:
   staphopain peptidase C47 family protein

Forward primer  1       GGACATGCCCTAGCAGTTGT  20
Template        978975  ....................  978956

Reverse primer  1       AGGCTTGAATCTGCATCTTGGA  22
Template        978866  ......................  978887
```

>CP001844.2 Staphylococcus aureus 04-02981, complete genome



شكل 115 : البوادي المصممة باستعمال Primer BLAST للتواليات المصطفة للجين المنتخب Staphopain من سلالات مختلفة لبكتريا *Staphylococcus aureus*

وتفاصيل البادي مرفقة مع الشكل .

ادخل التوالي الى برنامج Primer3 الذي أعطى بوادي مختلفة ومواصفاتها كما موضح في الفقرة الآتية

Primer3 Output

```
PRIMER PICKING RESULTS FOR Align sequence
No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO            start  len      tm     gc%    any    3'    seq
LEFT  PRIMER      164    22     60.74   45.45  6.00   2.00  TGAGCAAGACCTTCCTAATTGC

RIGHT  PRIMER     364    20     59.81   50.00  8.00   2.00  AGGGCATGTCCTAAATGTGG
SEQUENCE SIZE: 521
INCLUDED REGION SIZE: 521
PRODUCT SIZE: 201, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00
  1 AAGTTCAATATGAAAATACATTAAAAAACTTCAAAATTAGAGAACAACAATTCGATAACT

 61 CATGGTGTGCAGGATTTAGTATGGCAGCATTATTAAATGCAACTAAAAATACAGACACTT

121 ATAATGCACATGATATTATGCGTACATTATACCCTGAAGTAAGTGAGCAAGACCTTCCTA
                                              >>>>>>>>>>>>>>>>>
181 ATTGCTCAACATTCCCTAATCAAATGATTGAATACGGTAAATCACAAGGCAGAGATATTC
    >>>>>
241 ATTATCAAGAAGGCGTACCATCATATGAACAAGTTGATCAACTTACAAAAGATAATGTAG

301 GAATTATGATTCTTGCACAAAGTGTATCTCAAAACCCTAATGATCCACATTTAGGACATG
                                                <<<<<<<<<<<<<<<<
361 CCCTAGCAGTTGTTGGTAATGCTAAAATTAATGACCAAGAAAAACTTATTTACTGGAATC
    <<<<
421 CTTGGGATACAGAATTATCAATCCAAGATGCAGATTCAAGCCTATTACATTTATCATTCA

481 ATCGTGATTATAACTGGTATGGTTCAATGATAGGTTACTAA
KEYS (in order of precedence):
>>>>>> left primer
<<<<<< right primer
```

بوادىء اضافية

```
1 LEFT  PRIMER  start  len   tm     gc%    any    3'    seq
                 167    22   60.74  45.45  4.00   2.00  GCAAGACCTTCCTAATTGCTCA
  RIGHT  PRIMER  364    20   59.81  50.00  8.00   2.00  AGGGCATGTCCTAAATGTGG
PRODUCT SIZE: 198, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

2 LEFT  PRIMER   165    21   58.08  47.62  6.00   2.00  GAGCAAGACCTTCCTAATTGC

  RIGHT  PRIMER  364    20   59.81  50.00  8.00   2.00  AGGGCATGTCCTAAATGTGG
PRODUCT SIZE: 200, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00
```

كما ان نتائج Primer3plus موضحة في الفقرة الآتية

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

Primer3Plus loaded Fasta-File

Pair 1:

☑ Left Primer 1: Align sequence_F

Sequence: CGGTAAATCACAAGGCAGAGA

Start: 215 Length: 21 bp Tm: 60.3 °C GC: 47.6 % ANY: 3.0 SELF: 0.0

☑ Right Primer 1: Align sequence_R

Sequence: AGGGCATGTCCTAAATGTGG

Start: 364 Length: 20 bp Tm: 59.8 °C GC: 50.0 % ANY: 8.0 SELF: 2.0

Product Size: 150 bp Pair Any: 4.0 Pair End: 0.0

```
1     AAGTTCAATA TGAAAATACA TTAAAAAACT TCAAAATTAG AGAACAACAA
51    TTCGATAACT CATGGTGTGC AGGATTTAGT ATGGCAGCAT TATTAAATGC
101   AACTAAAAAT ACAGACACTT ATAATGCACA TGATATTATG CGTACATTAT
151   ACCCTGAAGT AAGTGAGCAA GACCTTCCTA ATTGCTCAAC ATTCCCTAAT
201   CAAATGATTG AATACGGTAA ATCACAAGGC AGAGATATTC ATTATCAAGA
251   AGGCGTACCA TCATATGAAC AAGTTGATCA ACTTACAAAA GATAATGTAG
301   GAATTATGAT TCTTGCACAA AGTGTATCTC AAAACCCTAA TGATCCACAT
351   TTAGGACATG CCCTAGCAGT TGTTGGTAAT GCTAAAATTA ATGACCAAGA
401   AAAACTTATT TACTGGAATC CTTGGGATAC AGAATTATCA ATCCAAGATG
451   CAGATTCAAG CCTATTACAT TTATCATTCA ATCGTGATTA TAACTGGTAT
501   GGTTCAATGA TAGGTTACTA A
```

Pair 2:

☐ Left Primer 2: Align sequence_1_F

Sequence: CGGTAAATCACAAGGCAGAG

Start: 215 Length: 20 bp Tm: 58.4 °C GC: 50.0 % ANY: 3.0 SELF: 0.0

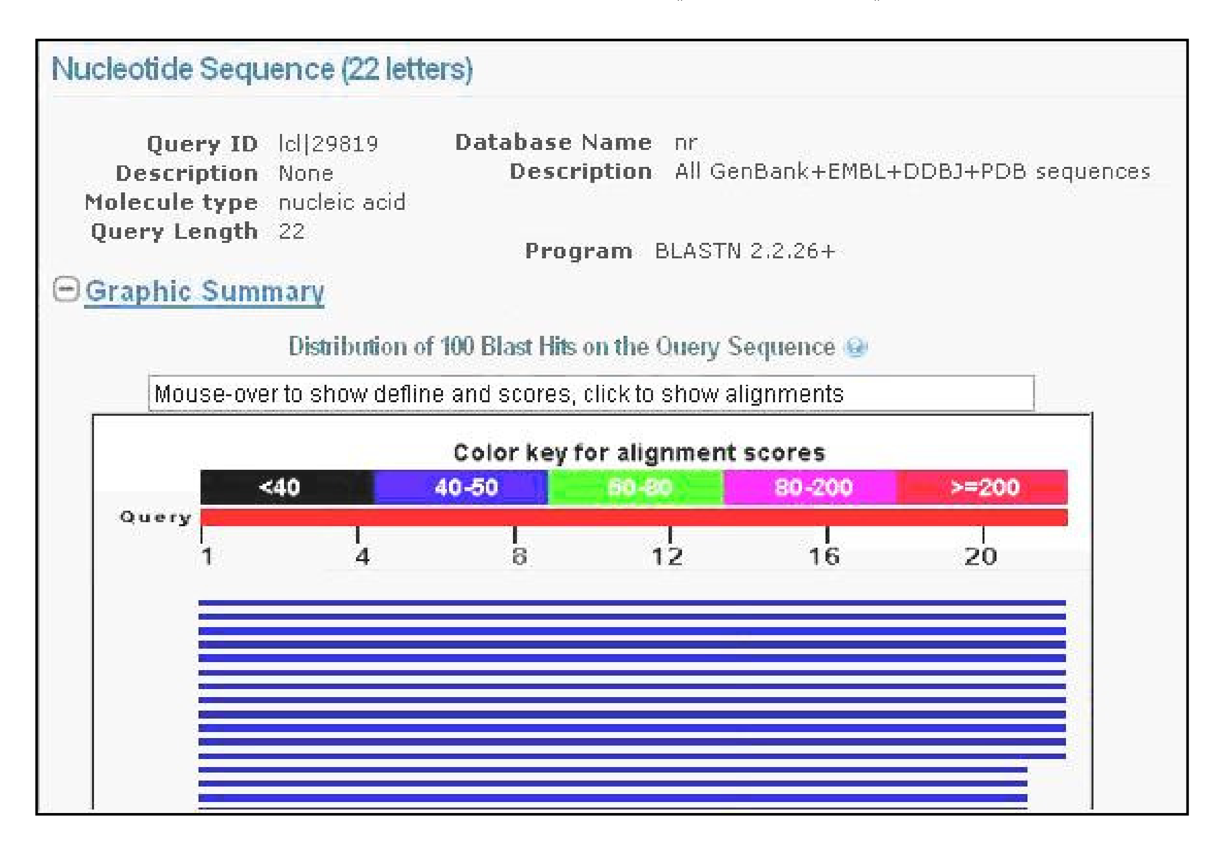
☐ Right Primer 2: Align sequence_1_R

Sequence: AGGGCATGTCCTAAATGTGG

Start: 364 Length: 20 bp Tm: 59.8 °C GC: 50.0 % ANY: 8.0 SELF: 2.0

Product Size: 150 bp Pair Any: 4.0 Pair End: 0.0

وكل البوادىء الناتجة لابد ان تخضع لعملية تأكد (Checking) وهذه تتم باستعمال برنامج BLASTN الخاص بصف التواليات القصيرة BLASTN 2.2.26+ (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) الذي يظهر التطابق مع ما موجود في قاعدة البيانات المستعملة nr ويظهر في الشكل التالي نتائج احد البوادىء



شكل 116 : نتائج الاصطفاف BLASTing لبعض البوادىء المصممة لغرض التأكد

مع المرفق النصي للتطابقات الذي يشير الى التواليات الممكن ان تعمل مع هذه البوادىء كما موضح في المرفق أدناه

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FR821779.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus LGA251 complete genome sequence	44.1	44.1	100%	0.007	100%
FR714927.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus ECT-R 2 complete genome	44.1	44.1	100%	0.007	100%
CP001844.2	Staphylococcus aureus 04-02981, complete genome	44.1	44.1	100%	0.007	100%
CP001781.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus ED98, complete genome	44.1	44.1	100%	0.007	100%
AP009324.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus Mu3 DNA, complete genome	44.1	44.1	100%	0.007	100%
CP000736.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus JH1, complete genome	44.1	44.1	100%	0.007	100%
CP000703.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus JH9, complete genome	44.1	44.1	100%	0.007	100%
BA000017.4	Staphylococcus aureus subsp. aureus Mu50 DNA, complete genome	44.1	44.1	100%	0.007	100%
BX571857.1	Staphylococcus aureus strain MSSA476, complete genome	44.1	44.1	100%	0.007	100%
BA000018.3	Staphylococcus aureus subsp. aureus N315 DNA, complete genome	44.1	44.1	100%	0.007	100%
BA000033.2	Staphylococcus aureus subsp. aureus MW2 DNA, complete genome	44.1	44.1	100%	0.007	100%
AJ538364.1	Staphylococcus aureus sspB gene for cysteine proteinase	44.1	44.1	100%	0.007	100%
CP003045.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus 71193, complete genome	42.1	42.1	95%	0.026	100%
CP003033.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus VC40, complete genome	42.1	42.1	95%	0.026	100%
CP003194.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus 11819-97, complete genome	42.1	42.1	95%	0.026	100%
CP003166.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus M013, complete genome	42.1	42.1	95%	0.026	100%
CP002643.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus T0131, complete genome	42.1	42.1	95%	0.026	100%
CP002110.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus TCH60, complete genome	42.1	42.1	95%	0.026	100%
CP002114.2	Staphylococcus aureus subsp. aureus JKD6159, complete genome	42.1	42.1	95%	0.026	100%
CP002120.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus str. JKD6008, complete genome	42.1	42.1	95%	0.026	100%
CP001996.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus ED133, complete genome	42.1	42.1	95%	0.026	100%
AM990992.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus ST398 complete genome	42.1	42.1	95%	0.026	100%
FN433596.1	Staphylococcus aureus subsp. aureus TW20, complete genome	42.1	42.1	95%	0.026	100%

وفضلا عن استعمال BLAST N يمكن الرجوع الى العديد من البرامج المذكورة سابقا للكشف عن صلاحية البوادىء المصممة والحصول على البيانات الخاصة بها .

المراجع

References

- Abd-Elsalam, K.2003.Bioinformatic tools and guidelines for PCR primer design .Afr.J.Biotechnol.**2**.91-95.
- Anjos,A. ,Msller,A., Ersbsll, B. , Finnie, C. and Shahbazkia , H. 2011. New approach for segmentation and quantification of two dimensional gel electrophoresis images. Bioinformatics ,**27**:368-375.
- Anna-Lee, D.,Simmonds, R.,Gargis, A. and Sloan,G. 2010. Prevalence and acquisition of the genes for zoocin A and zoocin A resistance in *Streptococcus equi* subsp.zooepidemicus.J.Mol.Evol.**68**:498-505. Aranda, P. , Lajoie, D. and Jorcyk, C. 2012. Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality.Electrophoresis.**33**:366-369.
- Armisen, R.1991. Agar and agarose biotechnological applications.Hydrobiology.**221**:159-166.
- Arnheim, N. and Erlich, H. 1992. Polymerase chain reaction strategy.Ann.Rev.Biochem.**61**:131-136.
- Altschul, S., Madden, T., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman D. (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nuc. Acids Res. **25**:3389-3402.
- Bajla, I., Hollander, I. and Burg, K.2001.Improvement of electrophoretic gel image analysis. Measurement Sci. Rev.**1**:5-10.
- Bardakci, F. 2001. Random amplification polymorphic DNA (RAPD) markers. Turk.J.Biol.**25**:185-196.
- Brody, J. and Kern,S.2004.History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. Anal. Biochem. **333**:1-13.
- Brody, J. , Calhoun, E., Gallmeier, E., Creavalle, T. and Kern, S. 2004. Ultra-fast high resolution agarose electrophoresis of DNA and RNA using low molarity conductive media. Biotechniques , **37**:598-602.
- Bridges,C.1990. Olga-oligonucleotide primer design program for the artist. Comput. Appl. Biosci., **6**:124-125.
- Brownie, J., Shawcross,S., Theaker, J., Whitcombe,D., Ferrie, R., Newton, C. and Little, S.1997.The elimination of primer dimer accumulation in PCR .Nuc.Acids.Res.**25**:3235-3241.
- Burpo,F. 2001. A critical review of PCR primer design algorithms and cross – hybridization case study. Biochemistry.**218**:1-12.
- Champlot , S., Berthelot,C. , Pruvost, M., Bennet, E., Grange, T. 2010. An efficient multi strategy DNA decontamination procedure of PCR reagents for hypersensitive PCR applications . PLoS ONE.**5**(9):e13042.
- Chow, W., McKlosky, C., Tong, Y., Hu, L., You, Q., Kelly, C. 2008. Application of isothermal helicase dependent amplification with a disposable detection devise in a simple sensitive stool test for toxigenic *Clostridium difficile*. J. Mol. Diagn. **10**:452-485.
- Cobb, B. and Clarkson, J. 1994. A simple procedure for optimizing polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. Nuc. ؛
- Collins, T. 2007. ImageJ for microscopy . Bio Techniques, **43**:25-30.
- Dennis, Y., Chiu, R. and Chan , K.(Eds). 2006. Clinical applications of PCR. Humana Press. Totowa, New Jersey, USA .
- Dieffenbach, C., Lowe, T. and Dveksler, G. 1993. General concepts for PCR primer design. Gen. Res. **3**:530-537.

- Dorfman, K. 2010. DNA electrophoresis in microfabricated devises . Rev. Mod. Phys. **82**:2903-2947.
- Duck, W., Steward, C., Banerjee, S., McGwan, J. and Tenover, F. 2003. Optimization of computer software setting improves accuracy of pulsed field gel electrophoresis macrorestriction fragment pattern analysis. J. Clin. Microbiol. **41**:3035-3042.
- Franca, L., Garrilho, E. and Kist, B. 2004. A review of DNA sequencing techniques . Quat. Rev. Biophy. **35**:169-200.
- Freifelder, D. 1982. Physical Biochemistry: Applications to Biochemistry and Molecular Biology. W.H. Freeman and Company. CA.
- Goyne, V., James, M., Ried, S. and Rybicki, E. (Eds) 2001. PCR Primer Design and Reaction Optimization . *In* " Molecular Biology Technique Manual " 3rd edition . University of Cape Town .
- Hamfjord, S., Stangle, A., and Skrede, M. 2012. *Kras* mutational tests for metastatic colorectal cancer patients: not just a technical problem. Expert. Rev. Mot. Diagn. **12**:123-126.
- Kirakawa, Y., Medh, R. and Metzemberg, S. 2010. Quantitative polymerase chain reaction analysis by deconvolution of internal standard. BMC. Mol. Biol. **11**:30-48.
- Isenbarger, T., Finney, M., Rios-Velazquez, C., Handelspnan, J. and Ruvkun, G. 2008. Miniprimer PCR: A new lens for viewing microbial world. Appl. Environ. Microbiol. **74**:840-849.
- Jensen, M., Fukushima, M. and Davis , R. 2010. DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich, constructs in *de novo* synthesis. PLoS ONE, **5**:e11024.
- Jung, V. and Pestka, S .1990. Efficient cloning of PCR generated DNA containing terminal restriction endonuclease recognition sites. Nuc. Acids. Res. **18**:6156.
- Kennedy, S. and Oswald, N. 2011. PCR troubleshooting and optimization: The essential Guide. Caister Academic press. UK.
- Korbie, D. and Mattick, J. 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. Nature Protocol.**3**:1452-1456.
- Kramer, M. and Coen, D. 2001. Enzymatic amplification of DNA by PCR : Standard procedures and optimization. Curr. Protocol. Mol. Biol. **15**:1-14.
- Kwok, P. 2001. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. Ann. Rev. Genome Hum. Gene. **2**:235-258.
- Loy, A., Arnold, R., Tischler, P., Rattei, T., Wagner, M. and Horn, M. 2008. ProbCheck- a central resource for evaluating oligonucleotide probe coverage and specificity. Environ. Microbiol. **10**:2894-2898.
- Mann, T.,Humbert,R., Dorschner, M., Stamatoyannopoulos, J. and Noble, W. 2009. A thermodynamic approach to PCR primer design. Nuc. Acids. Res. **37**:1-9.
- Mar-Aguilar, F., Gomez-Almaguer,D., Carrizales-Villareal, J., Viader-Salvado, J. and Barrera-Saldana, H.1998. Detecting residual ber-abl transicripts in chronic myloid leukaemia patients using coupled reverse transcriptase – polymerase chain reaction with rTth DNA polymerase. Clin. Lab. Hematol. **20**:221-224.
- Mercier , J., Slater, G. and Mayer, P. 2003. Solid phase DNA amplification : A simple Monte Carlo lattice model .Biophys. J. **85**: 2075-2086 .
- Mullis, K. 1990 . The unusual origin of the polymerase chain reaction . Sci Am . **262** : 56-61 .

- Ogden,R. and Adams, D.1987. Electrophoresis in agarose and acrylamide. Meth. Enzymol. **152**:61-87.
- Pavel, A. and Vasile , C. 2012 . PyElph : a software tool for images analysis and phylogenetics .BMC Bioinfornatics **13** : 9-16 .
- Pavlov, A., Belova, G., Kozyavkin, S., and Slesarev , A .2002 . Helix– hairpin– helix motifs confer salt resistance and processivity on chimeric DNA polymerases . Proc. Natl. Acad. Sci . **99** : 13510–13515 .
- Purdy,K., Embely,T.,Takii,S. and Nedwell,D.1996. Rapid extraction of DNA and rRNA for sediments by a novel hydroxylapatite spin-colum method. Appl. Environ. Microbiol. **62**:3905-3907.
- Rebrikov,D. and Trofimov, D., 2006. Real-time PCR: A review of approaches to data analysis. Appl. Biochem. Microbiol. **42**:455-463.
- Robertson, A. and Phillips, A. 2008.intigrating PCR theory and bioinformatics into a research oriented primer design exercise. CBE-Life Sci. Ed. **7**:89-95.
- Rotmistrovsky, K., Jang, W. and Schuler,G. 2004.A web server for performing electronic PCR . Nuc. Acids. Res. **32**:W108-W112.
- Roux, K. 1995. Optimization and troubleshooting in PCR. Gen. Res. **4**:S185-S194.
- Sambrook, J. and Russel, D. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual .3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press . Cold Spring Harbor, New York .
- SantaLucia, J. 1998. A unified view of polymer, dumbbell and oligonucleotide DNA nearest neighbor thermodynamics. Proc. Natl . Acad. Sci. **95**: 1460-1465.
- Sherry, S., Ward, M., Kholodov, M., Barker, J., Phan, L., Smigielski,E. and Sirotkin, K. 2001. dbSNP : the NCBI database of genetic variation . Nuc. Acids. Res. **29**:308-311.
- Singh, V. and Kumar, A. 2001. PCR primer design . Mol. Biol. Today. **2**:27-32.
- Skerra, A. 1992. Phosphorothioate primers improve the amplification of DNA sequences by DNA polymerase with proofreading activity. Nuc. Acids. Res. **20**:3551-3554.
- Spandidos, A., Wang, X., Wang , H., and Seed B . 2010 . PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification . Nuc. Acids Res. **38**:D792-D799.
- Spandidos, A., Wang, X., Wang , H., Dragnev, S. Thurber , T. and Seed , B . 2008 . A comprehensive collection of experimentally validated primers for Polymerase Chain Reaction quantitation of murine transcript abundance. BMC Genomics, **9**: 633-650 .
- Stellwagen, E. and Stellogen, N. 2002. The free solution mobility of DNA in tris-acetate-EDTA buffer of different concentrations, with and without added NaCl. Electrophoresis, **23**:1935-1941.
- Sykes, P., Neoh, S., Brisco, M., Hughes, E., Condon, J. and Morley, A. 1992. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. Biotechniques, **13**:444-449.
- Tsai, M., Lin,Y.,Cheng, Y., Lee, K., Huang, C., Chen,Y and Yao,A. 2007 . PrimerZ: streamlined primer design for promoters, exons and human SNPs . Nuc. Acids. Res.:W63-W65.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K. 1999. Digital PCR. Proc. Natl. Acad. Sci. **96**: 9236-9241.
- Wang , X. and Brian Seed , B. 2003 . A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. Nuc. Acids Res. **31**: e154; pp.1-8.
  Wang, X ., Spandidos, A., Huajun Wang , H. and Seed , B. 2012 . PrimerBank: a PCR

primer database for quantitative gene expression analysis, update. Nuc. Acids Res. **40** : D1144-1149.

- Zimmermann, B., Grill, S., Holzgreve, W., Zhong, X., Jackson, L. and Hahn, S. 2008. Digital PCR : A Powerful new tool for non-invasive prenatal diagnosis . Prenat. Diagn. **28**:1087-1093.

الفهارس

G

H

I

E

F

U

V

W

T

رقم الايداع في دار الكتب والوثائق ببغداد 560 لسنة 2013